

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ. Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis

Untersuchungen zum Vorkommen und zur Toxizität von
Stachybotrys chartarum in getrockneten Kräutern

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Barbara Biermaier
aus Traunstein

München 2013

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis
Koreferent/en:	Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

Tag der Promotion: 20. Juli 2013

Meinen Eltern, Geschwistern und Isabella

Abkürzungsverzeichnis

ad 1000	Auf Tausend aufzufüllen
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATTC	American Type Culture Collection
a_w	Wasseraktivität
c	Konzentration
C	Kohlenstoffatom
°C	Grad Celsius
CAD	Collision activated dissociation (Kollisionsgas)
CE	Collision energy
CEP	Cell entrance potential
Chs1	Chitinsynthase
CO ₂	Kohlendioxid
cps	counts per second
CUR	Curtain gas
CXP	Cell exit potential
CYA	Czapek Yeast Agar
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DG-18	Dichloran-Glycerin-Agar
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DP	Declustering potential
DTU	Technische Universität Dänemark
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EG	Europäische Gemeinschaft
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EP	Entrance potential
eV	Elektronenvolt
FKS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GKZ	Gesamtkeimzahl
GS1	Nebulizer gas
GS2	Heating gas
H	Wasserstoffatom
HeLa	HENRIETTA LACKS-Zellen (Humane Zervixkarzinom-Zellen)
HPLC	High performance liquid chromatography
IC ₅₀	Inhibitory concentration 50
ISV	Ion spray voltage
IT	Nährmedium nach VAN ITERSON
ITS	Internal transcribed spacer
KbE/g	Koloniebildende Einheiten pro Gramm
KG	Körpergewicht
kGy	Kilogray
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
L.	Botanisches Namenskürzel von LINNÉ
l	Liter
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LD ₅₀	Letale Dosis 50
M	Molar
M + NH ₄ ⁺	Masse plus Ammoniumion
MEA	Malzextraktagar

MEA ⁺	Malzextraktagar mit Antibiotikum
MEM	Minimum essential medium
mg	Milligramm
min	Minute
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
µM	Mikromolar
MRI	Max Rubner-Institut
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MVOCs	Microbial volatile organic compounds
MW	Molecular Weight
N	Stickstoffatom
n	Anzahl
Na-Acetat	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaNO ₃	Natriumnitrat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
NH ₄ NO ₃	Ammoniumnitrat
nm	Nanometer
O	Sauerstoffatom
OF	Nährmedium nach OHFF und WEISSBACH
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
ppb	Parts per billion
PDA	Potato Dextrose Agar
psi	Pound-force per square inch (Druckeinheit)
RA	Roridin A
RAPD	Randomly amplified polymorphic DNA
RE	Roridin E
RL-2	Roridin L-2
S.	<i>Stachybotrys</i>
S	SVEDBERG-Einheit (Sedimentationskoeffizient)
sek	Sekunde
SF	Satratoxin F
SG	Satratoxin G
SH	Satratoxin H
SK	Swine kidney-Zellen
spp.	Spezies
T	Temperatur
t	Zeit
TEM	Temperatur
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
Tri5	Trichodiensynthase
Tub2	β-Tubulin
∞	Unendlich
V	Volt
VA	Verrucarin A
VJ	Verrucarin J
VO	Verordnung
VOCs	Volatile organic compounds
z. A.	Zur Analyse

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Schrifttum	2
2.1	<i>Stachybotrys</i> spp.....	2
2.1.1	Taxonomie.....	2
2.1.2	Phänotypische Differenzierung.....	6
2.1.3	Genotypische Differenzierung	8
2.1.4	Bildung von Sekundärmetaboliten	10
2.1.4.1	Trichothecene.....	10
2.1.4.2	Atranone.....	13
2.1.4.3	Phenylspirodrimane.....	14
2.1.5	Wachstumsbedingungen und Vorkommen	15
2.1.6	Medizinische Bedeutung	16
2.1.7	Nachweisverfahren.....	19
2.1.7.1	Phänotypischer Nachweis	19
2.1.7.2	Toxinnachweis.....	21
2.1.7.2.1	MTT-Zellkulturtest.....	21
2.1.7.2.2	ELISA.....	22
2.1.7.2.3	LC-MS/MS	24
2.1.7.3	Genotypischer Nachweis.....	25
2.2	Gewürze	26
2.2.1	Herkunft und Eigenschaften von getrockneten Kräutern	28
2.2.1.1	Majoran	30
2.2.1.2	Oregano	31
2.2.1.3	Thymian.....	32
2.2.1.4	Bohnenkraut.....	33
2.2.2	Verarbeitung von Gewürzen	33
2.2.3	Mikrobiologischer Status von getrockneten Kräutern	34
2.2.4	Gewürze aus ökologischer Produktion	35

3	Material und Methoden	36
3.1	Material.....	36
3.1.1	Kräuter.....	36
3.1.2	Referenzstämme	38
3.1.3	Vergleichssequenzen	38
3.1.4	Toxin-Referenzsubstanzen.....	39
3.1.5	Nährmedien	40
3.1.6	Materialien und Geräte zur phänotypischen Untersuchung.....	40
3.1.7	Materialien und Geräte zur Untersuchung auf Toxinbildung.....	42
3.1.7.1	Toxinextraktion	42
3.1.7.2	MTT-Zellkulturtest.....	42
3.1.7.3	Trichothecen-ELISA	43
3.1.7.4	LC-MS/MS.....	43
3.1.8	Materialien und Geräte für genotypische Untersuchungen.....	44
3.1.8.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	44
3.1.8.2	Sequenzierung	44
3.2	Methoden.....	45
3.2.1	Anzucht der Referenzstämme	45
3.2.2	Bestimmung der mykogenen Gesamtkeimzahl und phänotypische Charakterisierung der Schimmelpilzisolat.....	45
3.2.2.1	Kulturmorphologie	45
3.2.2.2	Mikromorphologie	46
3.2.3	<i>Stachybotrys</i> -Isolate	46
3.2.4	Extraktion der <i>Stachybotrys</i> -Isolate	47
3.2.5	MTT-Zellkulturtest.....	48
3.2.6	ELISA	48
3.2.7	LC-MS/MS	49
3.2.8	PCR	51
3.2.8.1	ITS-Sequenz.....	53
3.2.8.2	Tri5-Sequenz.....	54
3.2.8.3	Tub2-Sequenz.....	55
3.2.8.4	Chs1-Sequenz.....	55
3.2.9	Sequenzierung.....	55

4	Ergebnisse	58
4.1	Mykogene Mikrobiota	58
4.2	Isolierung von <i>Stachybotrys</i> spp.	63
4.3	Phänotypische Charakterisierung der <i>Stachybotrys</i> -Isolate	65
4.4	Bildung von Toxinen	75
4.4.1	MTT-Zellkulturtest	75
4.4.2	ELISA	78
4.4.3	LC-MS/MS	79
4.5	Genotypische Charakterisierung der <i>Stachybotrys</i> -Isolate	83
4.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	93
5	Diskussion	98
6	Zusammenfassung	105
7	Summary	106
8	Literaturverzeichnis	107
9	Anhang	118
10	Danksagung	135

1 EINLEITUNG

Stachybotrys (S.) *chartarum* ist ein saprobiotisch wachsender, zellulolytischer Schimmelpilz, der sowohl auf welkendem Pflanzenmaterial, als auch auf zellulosehaltigen Baumaterialien vorkommt. Er ist als Produzent hochtoxischer Metabolite, den makrozyklischen Trichothecenen, bekannt.

Die Stachybotryotoxikose des Pferdes wurde bereits Anfang des 20. Jahrhunderts genauer untersucht, da viele Militärpferde, vor allem in Osteuropa, an dieser Erkrankung starben. Als Auslöser wurde mit *S. chartarum* kontaminiertes Heu und Stroh identifiziert. Eine Exposition des Menschen gegenüber *S. chartarum* findet infolge eines Befalls von Innenräumen, insbesondere bei erhöhtem Feuchtigkeitsgehalt, statt. Der Zusammenhang zwischen Erkrankungen wie dem sick-building-Syndrom, das mit Kopfschmerzen, Schwindel, Müdigkeit und Depressionen einhergeht, und dem Vorkommen von makrozyklischen Trichothecenen in der Raumluft wird diskutiert. Auch idiopathische pulmonale Hämorrhagien werden in engen Zusammenhang mit dem Auftreten von *S. chartarum* und makrozyklischen Trichothecenen in Innenräumen gebracht.

Über das Vorkommen von makrozyklischen Trichothecenen in Lebensmitteln ist der Literatur bisher nichts zu entnehmen. Getrocknete Kräuter bieten aufgrund ihrer bodennahen Kultivierung und Verarbeitung und ihres Zellulosegehaltes Schimmelpilzen und anderen Mikroorganismen ein optimales Milieu. Es ist bekannt, dass Kräuter eine Vektorfunktion für Bakterien, Schimmelpilze und Mykotoxine besitzen und somit ein Eintrag in Lebensmittel stattfinden kann. Die Bedeutung dieser Vektorfunktion wird dadurch verstärkt, dass die Kräuter häufig erst zum Schluss dem Gericht zugefügt und somit nicht mehr ausreichend erhitzt werden. Über das Vorkommen von *S. chartarum* und dessen Toxinen in Gewürzen und Kräutern ist allerdings nichts bekannt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, zu überprüfen, ob toxinogene *S. chartarum*-Stämme in Kräutern vorkommen. Zu diesem Zweck wurden getrocknete, gerebelte Kräuter der Spezies *Origanum majorana*, *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*/*Thymus zygis* und *Satureja hortensis* auf das Vorkommen dieses toxinbildenden Schimmelpilzes untersucht.

2 SCHRIFTTUM

2.1 *Stachybotrys* spp.

2.1.1 Taxonomie

Das Reich der Pilze (Mycota) gliedert sich nach SAMSON (2010) in vier Abteilungen: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* und *Chytridiomycota*. Diese Abteilungen werden zusammengefasst als Echte Pilze. Im Unterschied dazu teilen HIBBETT et al. (2007) die Mycota in folgende Abteilungen ein: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Chytridiomycota*, *Glomeromycota*, *Microsporidia* und *Neocallimastigomycota*. Die beiden ersteren bilden die Unterabteilung der *Dikarya*. Bei einer weiteren Abteilung, *Deuteromycota*, handelt es sich um eine formale Einteilung von Schimmelpilzen, die keine geschlechtliche Fortpflanzung aufweisen (GEDEK, 1980; SAMSON, 2010).

Die Gattung *Stachybotrys* gehört nach heutigem Wissensstand der Abteilung der *Ascomycota* an. Innerhalb der Klasse der *Sordariomycetes* zählen *Stachybotrys* spp. zur Ordnung der *Hypocreales* (Abbildung 1) (BLACKWELL et al., 2006; ANONYMOUS, 2012, 2013g).

Da von *Stachybotrys* spp. mit einer einzigen Ausnahme (*Stachybotrys albipes*) noch keine teleomorphe Form bekannt ist (CASTLEBURY et al., 2004), wird die Gattung häufig noch in die Abteilung der *Deuteromycota* und hier in die Klasse der *Hyphomycetes*, die Ordnung *Moniliales* und die Familie *Dematiaceae* (Schwärzepilze) eingeteilt (GEDEK, 1980; SAMSON, 2010) (Abbildung 1).

1837 beschrieb CORDA die Gattung *Stachybotrys* zum ersten Mal. Er bezeichnete die Spezies, die er auf einer Tapete in Prag gefunden hatte, als *S. atra* CORDA (CORDA, 1837). Die Bezeichnungen *S. chartarum* (EHRENBERG EX LINK) HUGHES (JONG und DAVIS, 1976) und *S. alternans* BONORDEN (BISBY, 1943) sind Synonyme für *S. atra* CORDA. Bis zu Beginn der 1940er Jahre existierte eine sehr uneinheitliche Taxonomie von *Stachybotrys* mit ca. 20 verschiedenen Bezeichnungen, wobei nicht klar war, ob es sich hierbei um Synonyme oder unterschiedliche Schimmelpilze handelte.

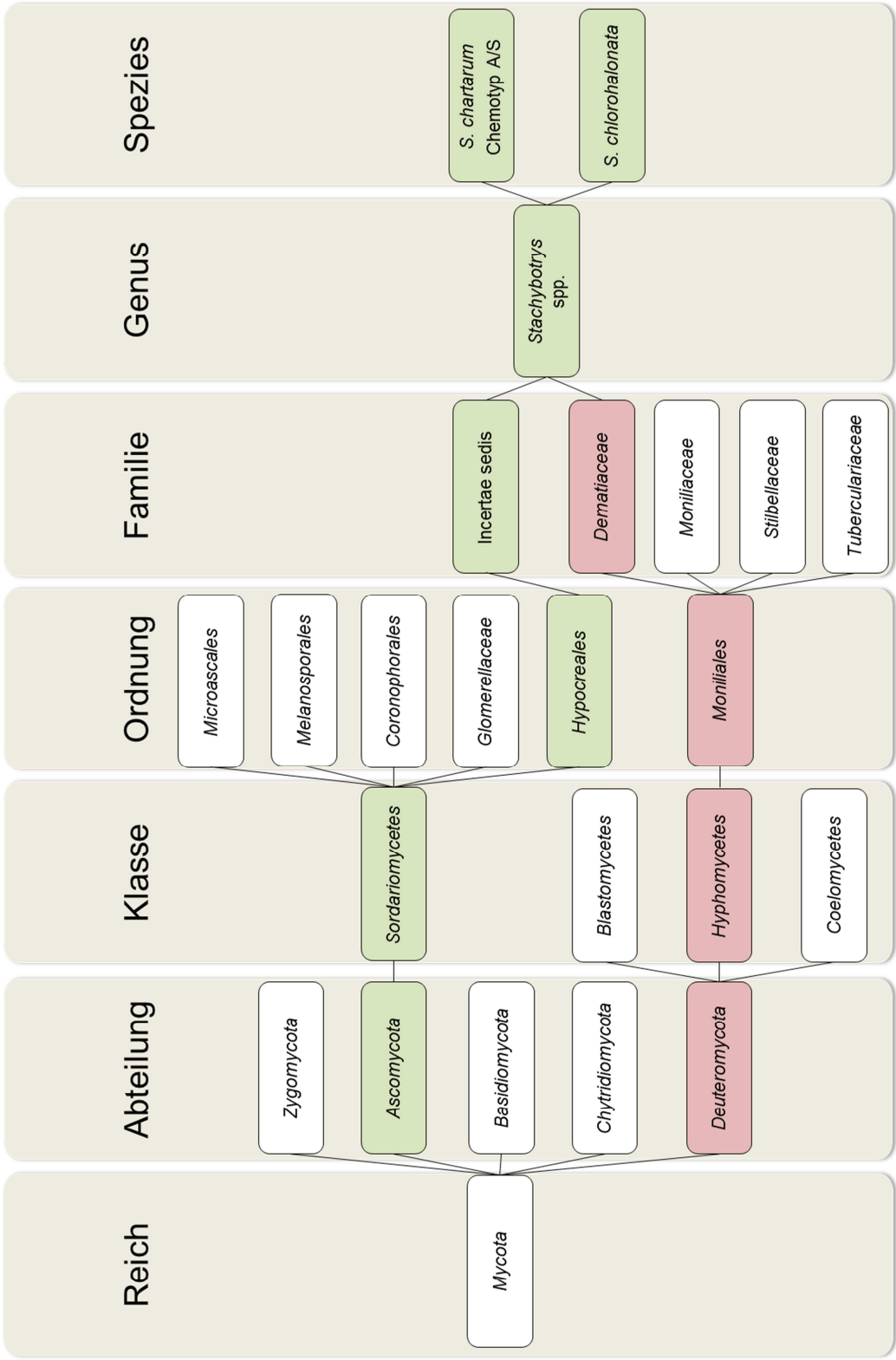


Abbildung 1: Taxonomische Einordnung für *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* im Reich der Pilze (zusammengestellt aus GEDEK, 1980; HIBBETT et al., 2007; SAMSON, 2010). Grün: aktuell gültige Einordnung (nach HIBBETT et al., 2007; ANONYMOUS, 2012). Rot: formale Einteilung aufgrund fehlender teleomorpher Form (nach GEDEK, 1980)

1943 erfolgte eine systematische Erfassung aller bis dahin bekannten Bezeichnungen für *Stachybotrys* durch BISBY. Dieser untersuchte die Pilze makroskopisch und mikroskopisch und teilte die Gattung *Stachybotrys* in zwei Spezies ein: *S. atra* CORDA und *S. subsimplex* COOKE. Alle weiteren früheren Bezeichnungen sah BISBY als Synonyme für *S. atra* CORDA an (Tabelle 1). Folgende Arten schloss BISBY aus der Gattung *Stachybotrys* aus, da ihre Gattungszugehörigkeit ungeklärt war: *S. crassa* EL MARCH (1895), *S. elata* SACCARDO, *S. papyrogena* (SACCARDO) SACC., *S. socia* (SACCARDO) SACC. und *S. elongata* PECK (BISBY, 1943).

Tabelle 1: Klassifizierung der *Stachybotrys*-Spezies und Synonyme für *S. atra* CORDA (nach BISBY, 1943)

Spezies	Synonym	Erstbeschreibung
<i>Stachybotrys subsimplex</i> COOKE		1883
<i>Stachybotrys atra</i> CORDA		1837
	<i>S. alternans</i> BONORDEN	1851
	<i>S. scabra</i> COOKE & HARKNESS	1884
	<i>S. dichroa</i> GROVE	1886
	<i>S. asperula</i> MASSEE	1887
	<i>S. verrucosa</i> COOKE & MASSEE	1888
	<i>S. atrogrisea</i> ELLIS & EVERH.	1888
	<i>S. gracilis</i> EM. MARCHAL	1894
	<i>S. elasticae</i> KOORD.	1907
	<i>S. dakotense</i> SACC.	1917
	<i>S. pulchra</i> SPEG.	-
	<i>S. cylindrospora</i> JENSEN	-
	<i>S. glinii</i> CIF.	-

-: keine Angabe

JONG und DAVIS (1976) erstellten eine neue Einteilung für die Gattung *Stachybotrys*. Sie untersuchten 50 Isolate aus der American Type Culture Collection (ATCC) und klassifizierten sie in 11 Spezies. Zwei Spezies wurden der Gattung *Memnoniella* zugeordnet (Tabelle 2).

Tabelle 2: Klassifizierung von *Stachybotrys* spp. (nach JONG und DAVIS, 1976)

Bezeichnung	Erstbeschreibung
<i>S. dichroa</i> GROVE	1886
<i>S. albipes</i> (BERKLEY & BR.) JONG & DAVIS	1902
<i>S. cylindrospora</i> JENSEN	1912
<i>Memnoniella echinata</i> (RIV.) GALLOWAY	1933
<i>S. kampalensis</i> HANSFORD	1943
<i>S. nephrospora</i> HANSFORD	1943
<i>S. theobromae</i> HANSFORD	1943
<i>S. parvispora</i> HUGHES	1952
<i>S. chartarum</i> (EHRENBERG EX LINK) HUGHES	1958
<i>Memnoniella subsimplex</i> (COOKE) DEIGHTON	1962
<i>S. bisbyi</i> (SRINIVASAN) BARRON	1964
<i>S. microspora</i> (MATHUR & SANKHLA) JONG & DAVIS	1966
<i>S. oenanthos</i> M.B.ELLIS	1971

Seit der Veröffentlichung von JONG & DAVIS wurden mehr als 25 weitere *Stachybotrys*-Spezies beschrieben. Von den heute mehr als 40 bekannten Spezies werden jedoch nur wenige regelmäßig in der Literatur erwähnt (ANDERSEN et al., 2003).

Die phylogenetische Einheit von *S. chartarum* ist nicht eindeutig definiert. So zeigten Analysenergebnisse zu den Sekundärmetabolitenprofilen von *S. chartarum*, dass innerhalb der Spezies zwei unterschiedliche Chemotypen existieren (JARVIS et al., 1998; VESPER et al., 1999).

Auch bei DNA-Analysen (randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-Analysen) traten Unterschiede zwischen einzelnen Isolaten auf (VESPER et al., 1999; VESPER et al., 2000). Ein Sequenzunterschied in der internal transcribed spacer (ITS)-Sequenz von verschiedenen *S. chartarum*-Isolaten weist ebenfalls auf das Vorhandensein zweier unterschiedlicher Spezies innerhalb von *S. chartarum* hin (HAUGLAND et al., 2001).

2002 fanden CRUSE et al. mit molekularbiologischen Methoden heraus, dass es sich bei den von ihnen untersuchten, morphologisch als *S. chartarum* eingestuften Isolaten um zwei phylogenetisch verschiedene Spezies handelte, *S. chartarum* und eine noch unbeschriebene Spezies (CRUSE et al., 2002).

ANDERSEN et al. (2003) beschrieben diese zweite, unbekannte Spezies aufgrund von morphologischen, chemischen und molekularbiologischen Eigenschaften als

S. chlorohalonata, so dass zum heutigen Zeitpunkt die ursprünglich morphologisch allein als *S. chartarum* identifizierten Isolate in zwei Spezies, *S. chartarum* mit den Chemotypen A und S sowie *S. chlorohalonata* eingeteilt werden können.

2.1.2 Phänotypische Differenzierung

S. chartarum:

S. chartarum bildet in Abhängigkeit des verwendeten Nährmediums unterschiedliche Kolonien aus. Auf Potato Dextrose Agar (PDA) erhält man nach sieben Tagen bei 25 °C grünlich-schwarze Kolonien von ca. 3 cm Durchmesser mit weißem Rand und schwarzer Rückseite. Auf Malzextraktagar (MEA) bleiben die Kolonien etwas kleiner und sind von grauer Farbe (SAMSON, 2010).

Mikroskopisch bildet *S. chartarum* einfache oder verzweigte Konidiophoren, die bis zu 100 µm lang und 2-3 µm im Durchmesser sind. Diese Konidiophoren sind an der Basis durchsichtig und glatt und werden zur Spitze hin dunkler und rauh. Jede Konidiophore trägt 4-10 eiförmige Phialiden von der Größe 9-13 x 4-6 µm, die ebenfalls glatt sind und zur Spitze hin dunkler werden (SAMSON, 2010).

Die ovalen Konidien werden von einer gallertartigen Substanz zu Köpfen zusammengehalten und sind je nach Alter transparent oder schwarz. Sie können rauh oder glatt sein und sind 8-12 x 4-5 µm groß (SAMSON, 2010) (Abbildung 2).

S. chlorohalonata:

Die Kolonien von *S. chlorohalonata* ähneln denen von *S. chartarum*, werden auf PDA jedoch nur ca. 2 cm und auf MEA 1,8 cm groß. Auf Czapek Yeast Agar (CYA) bildet *S. chlorohalonata* im Gegensatz zu *S. chartarum* einen Hof aus grünem, extrazellulärem Pigment. Mikroskopisch fallen bei *S. chlorohalonata* kurze Konidiophoren von 40-70 µm Länge auf. Diese tragen max. 5 Phialiden der Größe 8-11 x 4-6 µm. Die Konidien mit papillenförmiger Basis sind breit-oval, 8-11 x 5-7 µm groß, undurchsichtig und ihre Oberfläche variiert in Abhängigkeit des verwendeten Nährmediums von glatt bis rauh (ANDERSEN et al., 2003; SAMSON, 2010).

Die phänotypischen Charakteristika sind in Tabelle 3 vergleichend gegenübergestellt.

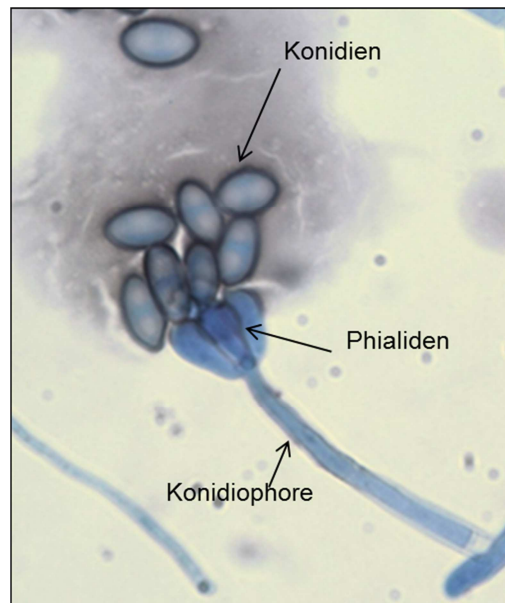


Abbildung 2: Lichtmikroskopische Aufnahme von *S. chartarum* (Tesapräparat, Anilinblau, 400-fache Vergrößerung (eigene Aufnahme))

Tabelle 3: Phänotypische Eigenschaften von *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* (nach SAMSON, 2010)

Struktur	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chlorohalonata</i>
Kolonie	22-30 mm Grau bis schwarz-grün, z.T. mit weißem Rand Pulverige bis federartige oder fadenförmige Oberfläche	18-20 mm Grau bis schwarz-grün mit grünem, extrazellulärem Pigment Pulverige bis federartige Oberfläche
Konidio-phoren	100 x 3-6 µm Basis glatt, durchscheinend Zur Spitze hin rauh, dunkel Einfach oder verzweigt	40-70 x 3-6 µm Basis glatt, durchscheinend Zur Spitze hin rauh, dunkel Einfach oder verzweigt
Phialiden	4-10/Konidiophore 9-13 x 4-6 µm Umgekehrt eiförmig Glatt, durchscheinend bis dunkel	3-5/Konidiophore 8-11 x 4-6 µm keulenförmig Glatt, durchscheinend bis dunkel
Konidien	8-12 x 4-5 µm Ellipsenförmig Rauh, durchscheinend bis undurchsichtig schwarz Von gallertartiger Substanz zu Köpfchen zusammengehalten	8-11 x 5-7 µm Oval, z. T. mit basaler Papille Glatt bis rauh, undurchsichtig schwarz-grün Von gallertartiger Substanz zu Köpfchen zusammengehalten

2.1.3 Genotypische Differenzierung

Molekularbiologisch lassen sich *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* anhand der Sequenzen der Genabschnitte ITS, Tri5, Tub2 und Chs1 unterscheiden.

Die ITS-Region stellt einen nichtcodierenden Abschnitt der ribosomalen DNA (rDNA) dar, der aufgrund seiner hohen Variabilität gut zur Speziesdifferenzierung geeignet ist (Abbildung 3). Die ITS-Sequenz von *S. chartarum* und der später als *S. chlorohalonata* beschriebenen zweiten Spezies unterscheidet sich durch eine einzige Basensubstitution (HAUGLAND und HECKMAN, 1998).

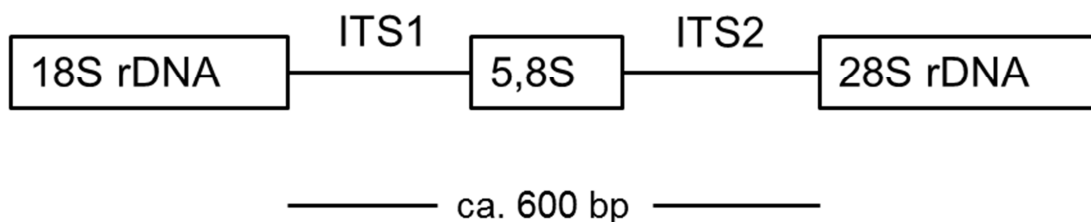


Abbildung 3: Lokalisation der ITS-Region von Schimmelpilzen (nach HAUGLAND und HECKMAN, 1998)

Das Tri5-Gen ist ein Schlüsselgen für die Produktion von Trichothecenen. Es codiert für die Trichodiensynthase, die die Bildung von Trichodien aus Farnesylpyrophosphat katalysiert (DOOHAN et al., 1999). Dies ist der erste Schritt in der Synthese von Trichothecenen (Abbildung 4). In der Sequenz des Tri5-Gens unterscheiden sich *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* durch 28 Substitutionen (ANDERSEN et al., 2003).

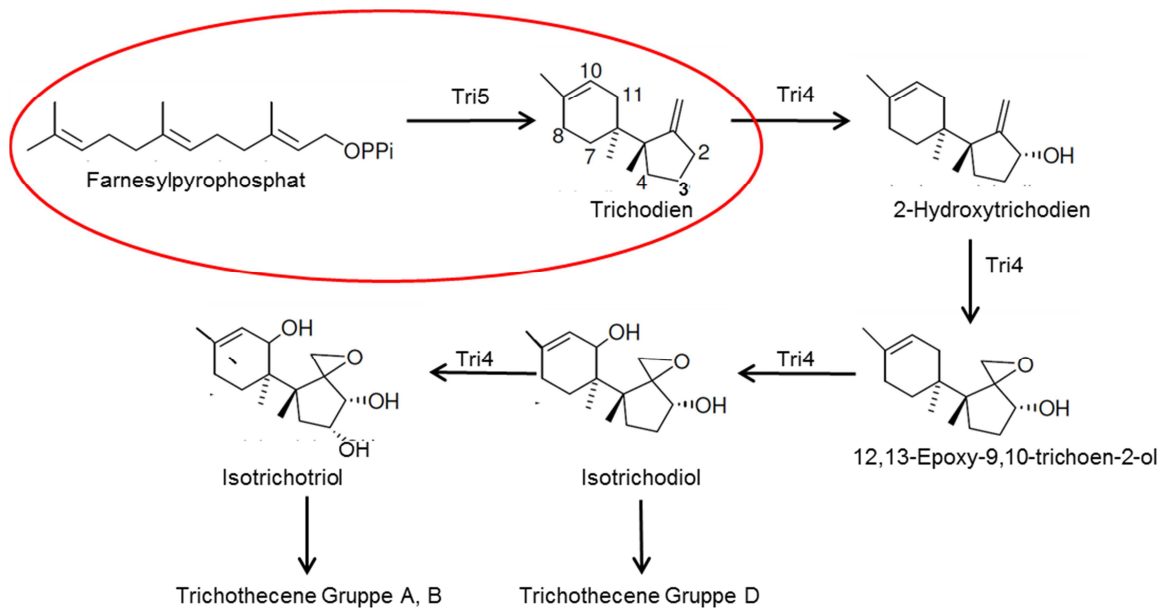


Abbildung 4: Schema der Trichothecensynthese aus Farnesylpyrophosphat mithilfe der Trichodien synthase (nach MCCORMICK et al., 2011)
 Rot: Bildung von Trichodien aus Farnesylpyrophosphat durch die Trichodien synthase.
 Tri5: Trichodien synthase 5, Tri4: Trichodien synthase 4

Der Genabschnitt Tub2 codiert für das tubuläre Protein β -Tubulin, das ein wichtiges Element des Zytoskeletts in eukaryotischen Zellen darstellt. Tubuline lagern sich zu Dimeren und Oligomeren zusammen, welche Mikrotubuli bilden. Diese sind neben dem Aufbau des Zytoskeletts auch an der Bildung des Spindelapparates bei der Mitose beteiligt (LÖFFLER, 2007). In diesem Genabschnitt unterscheiden sich *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* durch 27 Substitutionen (ANDERSEN et al., 2003).

Der Genabschnitt Chs1 codiert für die Chitinsynthase, ein Enzym, das für die Synthese von Chitin verantwortlich ist. Das Polysaccharid Chitin ist ein wichtiger Bestandteil der Zellwand von Schimmelpilzen sowie des Außenskeletts von Insekten und Krustentieren (JOLLÈS, 1999). Im Genabschnitt Chs1 unterscheiden sich *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* durch neun Substitutionen (ANDERSEN et al., 2003).

Die genotypische Differenzierung der beiden Chemotypen von *S. chartarum* (vgl. Kapitel 2.1.4) gelingt nur anhand der beiden Genabschnitte Tri5 und Chs1. In diesen beiden Genabschnitten liegt jeweils eine Basensubstitution vor (ANDERSEN et al., 2003).

2.1.4 Bildung von Sekundärmetaboliten

Isolate der Spezies *S. chartarum* zeigen unterschiedliche Sekundärmetabolitenprofile, was zur Einteilung in zwei Chemotypen (A und S) führte (JARVIS et al., 1998; VESPER et al., 1999). Etwa ein Drittel der untersuchten Isolate bildet neben einfachen Trichothecenen und Phenylspirodrimanen auch die hochzytotoxischen makrozyklischen Trichothecene, zwei Drittel bilden keine makrozyklischen Trichothecene, dafür aber Atranone (HINKLEY et al., 2000; ANDERSEN et al., 2002; NIELSEN et al., 2002). *S. chlorohalonata* ist ebenfalls ein Bildner von einfachen Trichothecen (Trichodermin, Trichodermol) und Atranonen (ANDERSEN et al., 2003). Eine Differenzierung zwischen *S. chartarum* Chemotyp A und *S. chlorohalonata* anhand des Sekundärmetabolitenprofils ist demnach nicht möglich (Tabelle 4).

Tabelle 4: Bildung von Sekundärmetaboliten durch *Stachybotrys* spp.
(nach ANDERSEN et al., 2003)

	<i>S. chartarum</i> Chemotyp A	<i>S. chartarum</i> Chemotyp S	<i>S. chlorohalonata</i>
Einfache Trichothecene	+	+	+
Makrozyklische Trichothecene	-	+	-
Atranone	+	-	+
Phenylspirodrimane	+	+	+

+: Bildung

-: Keine Bildung

2.1.4.1 Trichothecene

Trichothecene sind eine Gruppe von zyklischen Sesquiterpenen, die ca. 150 Substanzen umfasst. Sie sind durch eine Epoxygruppe zwischen Kohlenstoffatom C-12 und C-13, sowie häufig durch eine Doppelbindung zwischen Kohlenstoffatom C-9 und C-10 gekennzeichnet. An das trizyklische Grundgerüst sind Hydroxygruppen in unterschiedlicher Zahl und Position angelagert, die in verschiedener Weise verestert sein können. Aufgrund dieser unterschiedlichen chemischen Strukturen werden die Trichothecene in vier Typen (A-D) eingeteilt (UENO, 1983). Bezugnehmend auf den Syntheseweg der Trichothecene (Abbildung 4) stellt Isotrichodiol das Grundgerüst der Trichothecene des Typs D und Isotrichotriol das Grundgerüst der Trichothecene der Typen A und B dar (MCCORMICK et al., 2011).

Trichothecene vom Typ A und B werden hauptsächlich von Vertretern der Gattung *Fusarium* gebildet. Typ B unterscheidet sich von Typ A durch eine Ketogruppe an Kohlenstoffatom C-8 (UENO, 1983). Auch *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* bilden einfache Trichothecene vom Typ A, nämlich Trichodermol und Trichodermin (NIELSEN et al., 1998; ANDERSEN et al., 2002; ANDERSEN et al., 2003).

Typ C-Trichothecene besitzen eine oder mehrere zusätzliche Epoxygruppen und liegen als einfache oder makrozyklische Trichothecene vor. Letztere sind durch ein Ringsystem zwischen Kohlenstoffatom C-4 und C-15 gekennzeichnet. Typ C-Trichothecene wie z. B. die Baccharinoide und Crotocin werden hauptsächlich von Pilzen der Gattungen *Cephalosporium* und *Trichothecium* gebildet (COLE et al., 2003). JARVIS et al. (1987) berichteten über die Fähigkeit der Pflanzengattung *Baccharis*, von Schimmelpilzen gebildete makrozyklische Trichothecene über die Rhizosphäre aufnehmen und metabolisieren zu können. Die Pflanzen bildeten aus Typ D-Trichothecen (siehe unten) als Baccharinoide bezeichnete Phytotoxine. Später wurde gezeigt, dass Vertreter der Pflanzengattung *Baccharis* auch zur *de-novo*-Synthese von Typ D-Trichothecen in der Lage waren (JARVIS et al., 1988).

Trichothecene des Typs D sind makrozyklische Trichothecene, die jedoch nur eine Epoxygruppe zwischen den Kohlenstoffatomen C-12 und C-13 besitzen. Das trizyklische Grundgerüst bleibt immer gleich, während der Aufbau des makrozyklischen Rings je nach Trichothecen variiert (UENO, 1983). Hauptsächlich werden diese Sekundärmetabolite von Schimmelpilzen der Gattungen *Stachybotrys* und *Myrothecium* synthetisiert. *S. chartarum* bildet die makrozyklischen Trichothecene Satratoxin G, H und F, Roridin E und L-2 sowie Verrucarin J (Abbildung 5) (ANDERSEN et al., 2002; JARVIS, 2003). Roridin A und Verrucarin A hingegen gelten als typische Metabolite von *Myrothecium verrucaria* (COLE et al., 2003). Aus der Literatur sind keine Hinweise bekannt, dass *S. chartarum* ebenfalls in der Lage ist, Roridin A und Verrucarin A zu bilden.

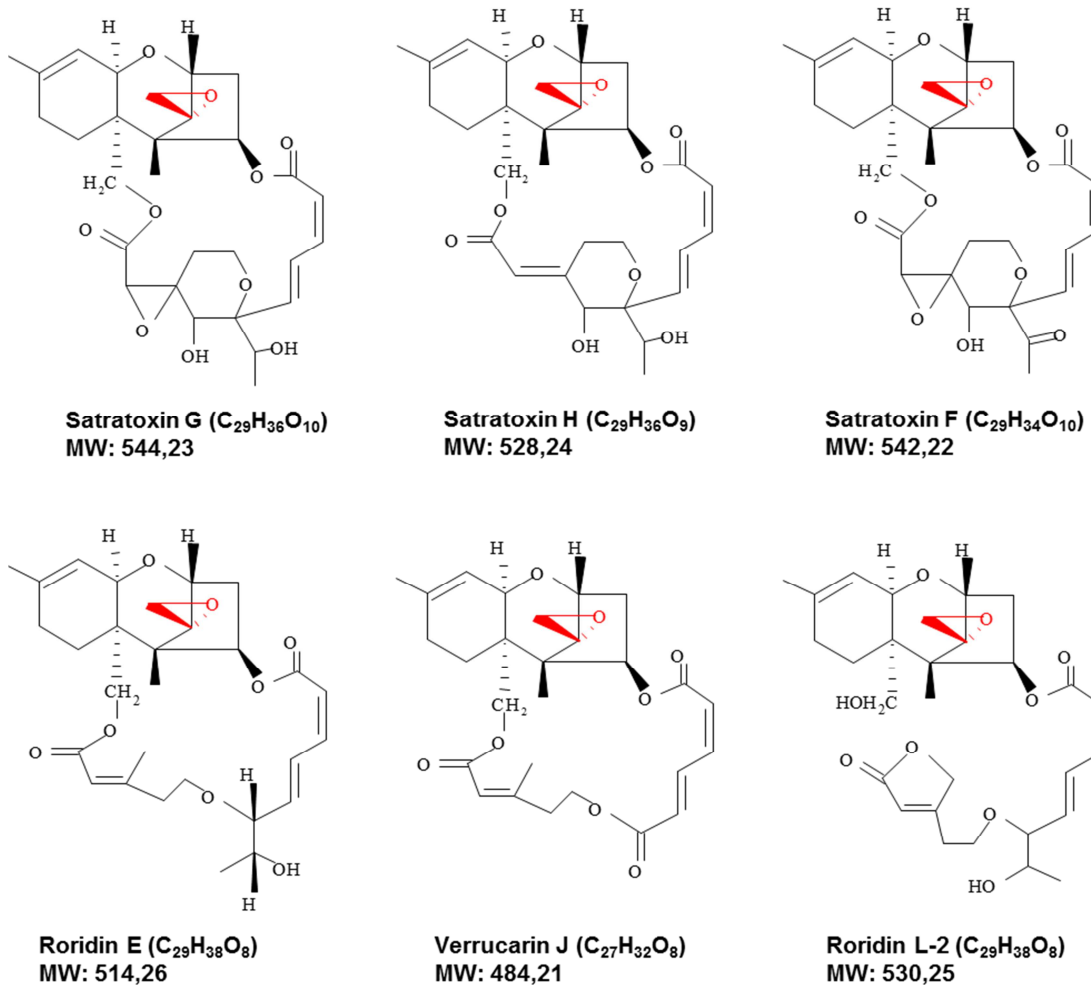


Abbildung 5: Strukturformeln der von *S. chartarum* gebildeten makrozyklischen Trichothecene (nach COLE et al., 2003). Isoformen sind nicht dargestellt. Rot: Epoxygruppe

Makrozyklische Trichothecene können über die Epoxygruppe zwischen Kohlenstoffatom C-12 und C-13 (Abbildung 5) irreversibel an die Ribosomen von eukaryotischen Zellen binden und so die Proteinbiosynthese hemmen. Daraus resultiert eine hochgradige Zytotoxizität, die bis zu 100-fach stärker als die einfacher Trichothecene ist (Tabelle 5), deren Bindung an die Ribosomen reversibel ist (JARVIS et al., 1998; GAREIS, 2006).

Außerdem wirken makrozyklische Trichothecene immunsuppressiv, sowie membran- und kapillargefäßschädigend, wodurch es zu Ödemen und Hautschädigungen kommen kann (UENO, 1984).

Tabelle 5: Toxizität und Zytotoxizität ausgewählter Trichothecene

Metabolit	Typ	LD ₅₀ [mg/kg KG]		IC ₅₀ [µg/ml]	
		Maus, intraperitoneal ¹	HeLa- Zellen ¹	SK- Zellen ³	Humane Lymphozyten ⁴
Roridin A	D	0,5	0,003	0,001	-
Verrucarín A	D	0,5	0,005	0,005	-
Satratoxin G	D	1,2 ²	-	0,007	-
Fusarenon-X	B	3,4	0,1	-	-
Nivalenol	B	4,1	0,3	1,950	0,106
T-2 Toxin	A	5,2	0,01	0,018	0,0006
Diacetoxyscirpenol	A	23,0	0,01	-	0,001
3-Acetyl- Deoxynivalenol	B	49,0	10,0	-	-
Deoxynivalenol	B	70,0	1,0	16,93	0,124

¹UENO (1983), ²YOSHIZAWA et al. (1986), ³GAREIS (2006), ⁴nach THUVANDER et al. (1999)

LD₅₀: Dosis, bei der 50 % der Versuchstiere sterben

IC₅₀-Wert (inhibitory concentration 50): Dosis, bei der die Zellviabilität um 50 % abnimmt

HeLa: HENRIETTA LACKS-Zellen (Humane Zervixkarzinomzellen)

SK: Swine kidney-Zellen

KG: Körpergewicht

2.1.4.2 Atranone

Atranone besitzen die Grundstruktur von Dolabellan-Diterpenen. Diese Struktur ist jedoch erweitert durch ein ungewöhnliches Enol-Lacton-System (Abbildung 6) (HINKLEY et al., 1999; HINKLEY et al., 2000; HINKLEY et al., 2003). *S. chartarum* Chemotyp A und *S. chlorohalonata* sind in der Lage, die Atranone A-K zu bilden (COLE et al., 2003; HINKLEY et al., 2003; JARVIS, 2003), deren chemische Struktur sich durch verschiedene Reste unterscheidet (Abbildung 6).

Atranone wirken im Gegensatz zu den Trichothecenen nicht zytotoxisch, gelten jedoch als proinflammatorisch wirksam. Die Inokulation von Mäusungen mit Sporen eines atranonbildenden *S. chartarum* führte zu einem erheblichen Anstieg von Entzündungsmediatoren wie Stickstoffmonoxid, Interleukin-6 und TNF-α (RUOTSALAINEN et al., 1998; RAND et al., 2006). Der genaue Mechanismus, der zu diesen Veränderungen führt, ist noch nicht bekannt (PIECKOVA et al., 2006).

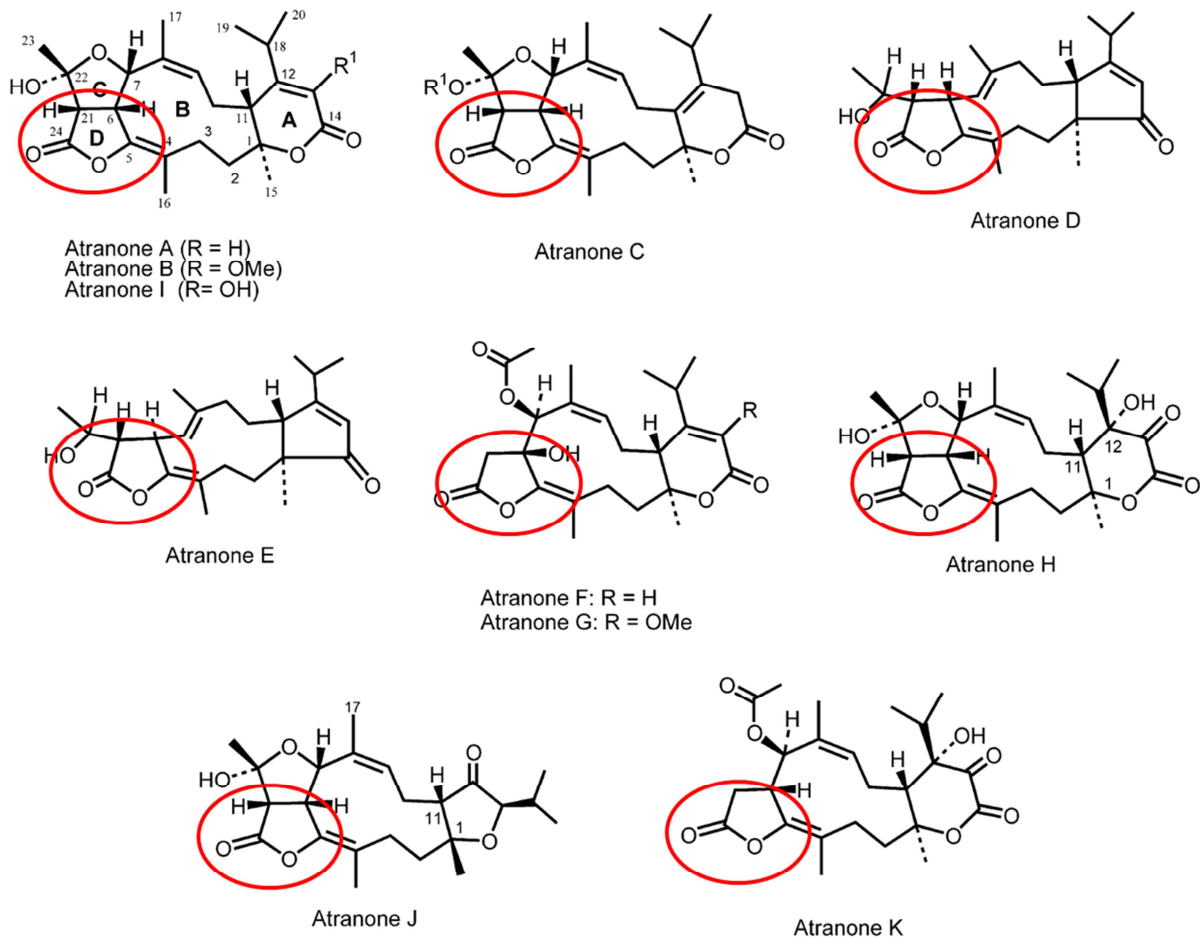


Abbildung 6: Strukturformeln der Atranone (nach JARVIS, 2003), rot: Enol-Lacton-System

2.1.4.3 Phenylspirodrimane

Phenylspirodrimane entstehen zum Teil über den Terpensyntheseweg und zum Teil über den Polyketidsyntheseweg (Abbildung 7) (NIELSEN, 2003). Abbildung 7 zeigt die chemische Struktur der Phenylspirodrimane Stachybotryamid, Stachybotrylactam und Stachybotrylacton, die von *S. chartarum* und *S. chloro-halonata* gebildet werden.

Phenylspirodrimane besitzen eine Reihe von toxischen Wirkungen. Sie schwächen das Immunsystem durch Hemmung des Komplementsystems, inhibieren proteolytische Enzyme und vermindern die Ausschüttung von TNF- α . Desweiteren stimulieren sie die Fibrinolyse und die Thrombolyse und haben zytotoxische und neurotoxische Auswirkungen (NIELSEN, 2003; PESTKA et al., 2008). Die Zytotoxizität dieser Stoffe ist deutlich geringer als die der makrozyklischen Trichothecene (JARVIS et al., 1995).

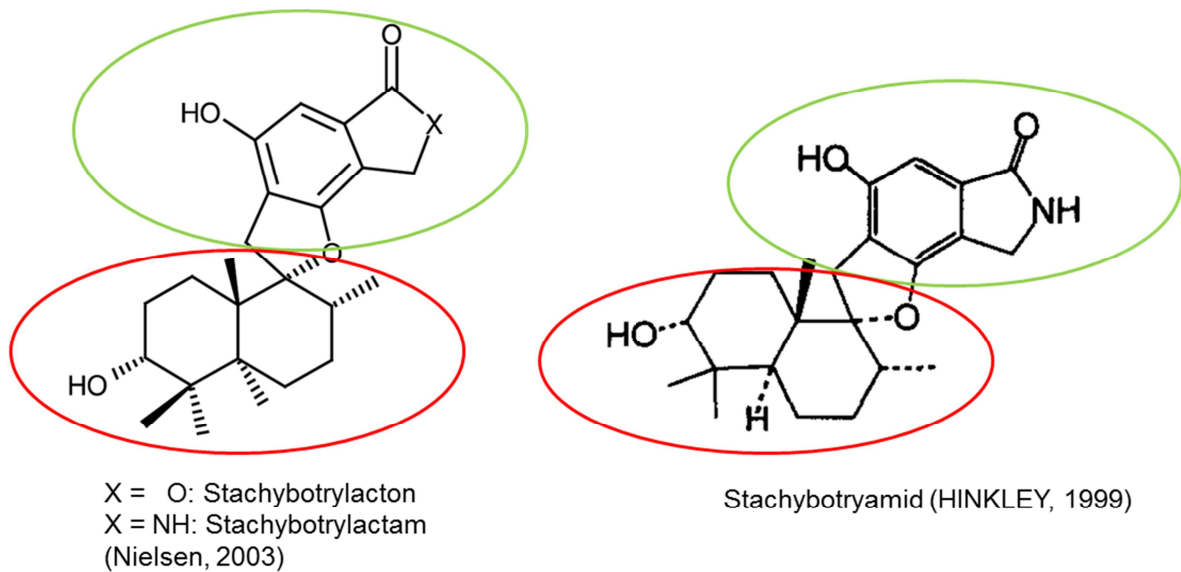


Abbildung 7: Strukturformel der Phenylspirodrimane Stachybotryamid, Stachybotrylactam und Stachybotrylacton, (HINKLEY et al., 1999; NIELSEN, 2003); Grün: Bildung über Terpensyntheseweg, rot: Bildung über Polyketidsyntheseweg

2.1.5 Wachstumsbedingungen und Vorkommen

S. chartarum ist ein weltweit vorkommender, saprobiotischer Schimmelpilz, der aufgrund seines zellulolytischen Potentials auf welkendem Pflanzenmaterial wie z.B. Heu oder Stroh wächst. Auch Papier, Rigipsplatten oder Tapeten bilden insbesondere bei ausreichend feuchtem Milieu ein günstiges Habitat für den Pilz (HINTIKKA, 1977a; JARVIS et al., 1983; OHFF und WEISSBACH, 1984; HARRACH et al., 1987; KLUWE, 2006).

Bevorzugte Wachstumsbedingungen sind Temperaturen zwischen 20 und 25 °C, eine Feuchtigkeit von mind. 60 % und ein pH-Wert von 5,6 - 6,6. Jedoch werden auch wesentlich höhere Schwankungen dieser Werte toleriert (FORGACS und CARLL, 1962; GEDEK, 1980). Wird die Temperatur während der Bebrütung vorübergehend auf 10 °C abgesenkt, kommt es zu einer Stagnation des Wachstums (HÖHNE, 2008).

FRAZER et al. (2011) untersuchten den Zusammenhang zwischen a_w -Wert und Temperatur und deren Auswirkung auf Auskeimung, Koloniewachstum, Sporenbildung und Toxinbildung (Satratoxin G). Bei hohem a_w -Wert waren 25 °C optimal für das Wachstum von *S. chartarum*, während bei geringer Erniedrigung des a_w -Wertes die Temperatur für ein optimales Wachstum auf 30 °C erhöht

werden musste. Für optimales Wachstum in Verbindung mit Sporenbildung war eine Temperatur von 30 °C bei hohem a_w -Wert nötig. Bei einem a_w -Wert von 0,95 verringerte sich das Wachstum der Kolonien drastisch, während die Sporulation nicht beeinflusst wurde. Ebenso fand auch noch bei kälteren Temperaturen bis 15 °C eine Sporulation statt. Die höchste Satratoxin G-Bildung durch *S. chartarum* fand bei einer Temperatur von 20 °C und a_w -Werten zwischen 0,96 und 0,98 statt. HÖHNE (2008) stellte fest, dass die Toxinproduktion von *S. chartarum* nach drei Wochen ein Maximum erreichte, im weiteren Verlauf nahm die Konzentration an Satratoxinen wieder ab. Auch ein vorübergehendes Absenken der Temperatur auf 10 °C während der Bebrütung führte zu einer Stagnation der Toxinproduktion.

2.1.6 Medizinische Bedeutung

S. chartarum ist bereits seit den 1920er Jahren als Auslöser von Krankheiten bekannt. Der ungarische Tierarzt JARMAI beschrieb 1929 erstmals eine Krankheit bei Pferden, die mit Nekrosen und Geschwüren im Nasen- und Maulbereich, Hämorrhagien von Schleimhäuten, serösen Häuten, Muskeln und Gehirn sowie häufigen Todesfällen einherging (JARMAI, 1929). Erst 1938 wurde *S. alternans* BONORDEN als Auslöser der Erkrankung identifiziert, die daraufhin als Stachybotryotoxikose bezeichnet und durch verschiedene Fütterungsversuche mit Pferden bestätigt wurde (MOSELIANI, 1940; DROBOTKO, 1945; FORGACS und CARLL, 1962).

Die Stachybotryotoxikose beim Pferd lässt sich in zwei Verlaufsformen unterteilen (HINTIKKA, 1977b): Die typische Verlaufsform ist durch drei Phasen gekennzeichnet und tritt bei längerer Exposition gegenüber geringen Toxinmengen auf. Hierbei folgen auf Nekrosen und Ödeme im Maulbereich zunächst Leukozytopenien und Thrombozytopenien bis hin zum völligen Verlust der Blutgerinnung und schließlich hohes Fieber und massive Kreislaufstörungen. Die Tiere leiden unter blutigen Durchfällen, tragende Stuten erleiden Aborte. Ein bis sechs Tage nach Erreichen der dritten Phase führt die Erkrankung zum Tod (FORGACS und CARLL, 1962; MOROSHKIN, 1968).

Die atypische Verlaufsform (akute Intoxikation) tritt bei einmaliger Aufnahme hoher Toxinmengen auf und erfolgt schockartig. Hauptsymptome sind neurologische Störungen wie Sensibilitätsverlust, Hyperirritabilität, Hyperästhesie, Seh- und Koordinationsstörungen. Die Tiere werden apathisch und stellen die

Futteraufnahme ein. Bei dieser Form treten keine Veränderungen im Blutbild auf. Nach 12-24 Stunden kommt es meist zu erhöhter Atemfrequenz, Zyanose und Hämorrhagien auf den sichtbaren Schleimhäuten sowie zu klonischen Krämpfen, Tremor und Kreislaufversagen mit tödlichem Ende (FORGACS und CARLL, 1962). Außer bei Pferden wurde die Krankheit auch bei Schweinen, Wiederkäuern, Geflügel und Hunden beschrieben (FORGACS und CARLL, 1962; HARRACH et al., 1983).

Bei der Untersuchung von Futtermitteln nach Erkrankung von ungarischen Sportpferden zeigte sich, dass *S. chartarum* und die von ihm gebildeten makrozyklischen Trichothecene in Heu und Stroh vorkommen, während in Futtergetreide die Fusarientoxine eine größere Rolle spielen (HARRACH et al., 1987). In neueren Studien untersuchten GOTTSCHALK et al. (2009) eine kleine Anzahl Haferproben (n=17) aus der amtlichen Futtermittelüberwachung auf das Vorkommen von makrozyklischen Trichothecenen vom Typ D. Alle Proben waren jedoch negativ.

Bei Untersuchungen von Heu- und Strohproben aus Pferdeställen wurden toxinogene *Stachybotrys* spp. isoliert. Bei mehr als 30 % der untersuchten *Stachybotrys*-Isolate wurde das Tri5-Gen und damit die Fähigkeit zur Bildung makrozyklischer Trichothecene nachgewiesen (KLUWE, 2006).

Seit den 1990er Jahren steht *S. chartarum* im Verdacht, als Kontaminant von Innenräumen mitverantwortlich für Erkrankungen des Menschen zu sein. Die Symptome reichen von unspezifischen Beschwerden wie Kopfschmerzen, Übelkeit, Müdigkeit, Schwindel und Depressionen bis hin zu schweren Erkrankungen wie pulmonalen Hämorrhagien. Diese Erkrankungsfälle stehen in engem Zusammenhang mit dem Auftreten von Wasserschäden in betroffenen Wohnungen und gleichzeitigem Vorkommen von *S. chartarum* (ETZEL et al., 1998). Besondere Aufmerksamkeit erlangten *S. chartarum* und die von ihm gebildeten Toxine in den Jahren 1993-2000, als im Raum Cleveland 41 Kleinkinder an akuter pulmonaler Hämorrhagie erkrankten und 12 von ihnen starben. Die Wohnungen dieser Kinder waren nach Wasserschäden mit *S. chartarum* befallen (DEARBORN et al., 2002).

Obwohl derartige Erkrankungen immer wieder im Zusammenhang mit dem Vorkommen von *S. chartarum* in Innenräumen auftraten (JOHANNING et al., 1996; DEARBORN et al., 1999; SCHEEL et al., 2001), ist nicht endgültig ge-

sichert, ob makrozyklische Trichothecene die alleinigen Auslöser für das Syndrom sind, da auch andere Komponenten, wie Stäube, flüchtige organische Komponenten (volatile organic compounds (VOC`s) und microbial VOC`s (MVOC`s)) und Bakterien eine Rolle spielen könnten (TERR, 2001; KUHN und GHANNOUM, 2003). Allerdings ist bekannt, dass makrozyklische Trichothecene in verschimmelten Tapeten und Gipskartonplatten vorkommen (GAREIS, 1994; JOHANNING et al., 1996; ANDERSSON et al., 1997; NIELSEN et al., 1998; GOTTSCHALK et al., 2006) und in die Umgebungs- und Raumluft schimmelbelasteter Innenräume übergehen können (JOHANNING, 1994; BRASEL et al., 2005; BLOOM et al., 2007; GOTTSCHALK et al., 2008), wodurch eine tatsächliche inhalative Belastung mit diesen Mykotoxinen aufgezeigt wurde. Dabei spielt vermutlich auch die Fähigkeit der Pilze zur Bildung von toxinhaltigen Guttationströpfchen eine Rolle (GAREIS et al., 2011), da die Toxine auf diese Weise in die Umgebung abgesondert werden können.

Bei der Sanierung *Stachybotrys*-belasteter Gebäude sollten auch die Erkenntnisse von NIELSEN et al. (2004) und FRAZER et al. (2011) miteinbezogen werden, wonach auch bei Abtrocknung (a_w -Werte von 0,95) und Senkung der Temperatur (bis 15 °C) noch Sporen durch *S. chartarum* gebildet werden können.

Die orale Aufnahme von *Stachybotrys*-Toxinen über Lebensmittel ist kaum untersucht. Zwar bieten welkende Pflanzenmaterialien wie Kräuter und Gewürze einen guten Nährboden für den zelluloseverwertenden Schimmelpilz, jedoch gibt es in der Literatur keine Hinweise auf das Vorkommen von makrozyklischen Trichothecenen in derartigen Lebensmitteln. Für Untersuchungen von Getreideproben entwickelten STACK und EPPLEY (1980) eine Methode zum Nachweis von Satratoxin G und H, untersuchten aber keine natürlich kontaminierten Proben. Andere Untersuchungen zum Vorkommen von makrozyklischen Trichothecenen in Getreide umfassten keine Satratoxine (STECHER et al., 2007). GOTTSCHALK et al. (2009) untersuchten Getreideproben aus der amtlichen Lebensmittelüberwachung ($n = 289$) und wiesen eine gleichzeitige Belastung der Proben mit verschiedensten Trichothecenen (Typ A und B) nach. Makrozyklische Trichothecene vom Typ D (Satratoxine, Verrucarine, Roridine) wurden allerdings nicht gefunden.

2.1.7 Nachweisverfahren

2.1.7.1 Phänotypischer Nachweis

Für den Nachweis und die Identifizierung von Schimmelpilzen stehen je nach Nährstoff- und Wasserbedarf der verschiedenen Gattungen eine Reihe von Nährmedien zur Verfügung (Tabelle 6).

Die Anzucht von *Stachybotrys* spp. ist grundsätzlich auf den meisten gängigen Nährmedien zum Schimmelpilznachweis möglich. Bei Mischkulturen mit Schimmelpilzen schnell wachsender Gattungen wie z.B. *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus* oder *Penicillium*, kann es jedoch leicht zu einer Überwucherung kommen, da *Stachybotrys* spp. sehr langsam wachsen. Für die Anzucht von Schimmelpilzen aus Probenmatrices werden Antibiotika zugegeben, um das Wachstum von in der Matrix vorhandenen Bakterien zu verhindern (SAMSON, 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Bestimmung der mykogenen Gesamtkeimzahl und die Isolierung von *Stachybotrys* spp. mit folgenden vier Nährmedien gearbeitet (Zusammensetzung vgl. Tabelle 6):

Malzextraktagar:

Malzextraktagar (MEA) eignet sich gut zur Diagnostik von Schimmelpilzen, die sowohl Nährstoffe als auch moderate Feuchtigkeit benötigen (SAMSON, 2010). Für die Anzucht von *Stachybotrys*-Reinkulturen ist dieser Agar gut geeignet, jedoch kann es vorkommen, dass die Pilzkolonien schlecht sporulieren (ANDERSEN und NISSEN, 2000). Bei der Isolierung von *Stachybotrys* spp. aus Mischproben besteht die Gefahr der Überwucherung durch schnellwachsende Schimmelpilze.

Dichloran-Glycerin-Agar:

Dichloran-Glycerin-Agar (DG-18) wurde speziell für xerophile Schimmelpilze wie z.B. *Eurotium* spp. entwickelt. Feuchtigkeitsliebende Pilze werden in ihrem Wachstum gebremst und expansiv wachsende Schimmelpilze wie *Rhizopus* spp. und *Mucor* spp. werden durch das Dichloran gehemmt (SAMSON, 2010). *Stachybotrys* spp. wachsen auf DG-18 gar nicht oder nur sehr restriktiv (ANDERSEN und NISSEN, 2000).

Tabelle 6: Auswahl an Nährmedien für die mykologische Untersuchung (nach Samson, 2010)

Nährmedium	Zusammensetzung	Einsatzbereich
Malzextraktagar (MEA)	50 g Malzextrakt 0,01 g $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ad 1000 ml Aqua dest.	Mykologische Untersuchung von Proben mit hohem a_w -Wert Anzucht von Reinkulturen Anzucht von <i>Stachybotrys</i> spp.
Dichloran-18 % Glycerin-Agar (DG-18)	31,5 g Dichloran-Glycerin-Agar 220 g wasserfreies Glycerin 0,01 g $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g Chloramphenicol 0,05 g Chlortetracyclin (nach dem Autoklavieren) ad 1000 ml Aqua dest.	Mykologische Untersuchung von Proben mit niedrigem a_w -Wert Anzucht von xerophilen Schimmelpilzen
V8 juice agar (V8)	175 ml V8® Gemüsesaft 825 g CaCO_3 0,01 g $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 20 g Agar 825 ml Aqua dest.	Untersuchung von Obst, Gemüse und Pflanzenmaterial Anzucht von <i>Stachybotrys</i> spp.
VAN ITERSON (IT) (FORGACS und CARLL, 1962)	0,5 g NH_4NO_3 0,5 g KH_2PO_4 ad 1000 ml Aqua dest.	Isolierung zellulolytischer Schimmelpilze mit hohem Feuchtigkeitsanspruch
OHFF und WEISSBACH (OF) (OHFF und WEISSBACH, 1984)	0,5 g KH_2PO_4 0,5 g NaNO_3 0,1 g NaCl ad 1000 ml Aqua dest.	Isolierung zellulolytischer Schimmelpilze mit hohem Feuchtigkeitsanspruch
Oatmeal Agar (OA)	30 g Hafermehl/-flocken 0,01 g $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 15 g Agar ad 1000 ml Aqua dest.	Kultivierung von Schimmelpilzen (Bildung von Makrosporen) Anzucht von <i>Stachybotrys</i> spp.
Potato Dextrose Agar (PDA)	39 g Potato Dextrose Agar 0,01 g $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ad 1000 ml Aqua dest.	Identifizierung von Hefen und Schimmelpilzen Bestimmung der mykogenen Gesamtkeimzahl Anzucht von <i>Stachybotrys</i> spp.
Potato Sucrose Agar (PSA)	39 g Potato Sucrose Agar 0,01 g $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ad 1000 ml Aqua dest.	Identifizierung von Hefen und Schimmelpilzen Bestimmung der mykogenen Gesamtkeimzahl Anzucht von <i>Stachybotrys</i> spp.
Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA)	1 g KH_2PO_4 1 g KNO_3 0,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g KCl 0,2 g Glucose 0,2 g Sucrose 20 g Agar ad 1000 ml Aqua dest.	Anzucht von Fusarien Anzucht schlecht versporender Schimmelpilze Anzucht von <i>Stachybotrys</i> spp.

Nährmedium nach VAN ITERSON:

Das Nährmedium nach VAN ITERSON (IT) wird in Kombination mit der Filterpapiermethode nach BATA et al. (1985) verwendet. Hierbei wird ein Rundfilter in eine Petrischale gelegt und mit dem VAN ITERSON-Nährmedium (FORGACS und CARLL, 1962; HINTIKKA, 1977a) befeuchtet. Dies stellt optimale Bedingungen für einen feuchtigkeitsliebenden, zellulolytischen Schimmelpilz wie *Stachybotrys* spp. dar, während andere, z. T. schnellwachsende Pilze gehemmt werden, da ihnen Nährstoffe fehlen. Nach ca. einer Woche Bebrütung bei 25 °C lassen sich so *Stachybotrys* spp. identifizieren und abimpfen (FORGACS und CARLL, 1962).

Nährmedium nach OHFF und WEISSBACH:

Das Nährmedium nach OHFF und WEISSBACH (OF) wird ebenso wie das Nährmedium nach VAN ITERSON angewendet und eignet sich gut zur Identifizierung und Isolierung von zellulolytischen Schimmelpilzen wie *Stachybotrys* spp., da diese alle nötigen Nährstoffe und Feuchtigkeit erhalten. Andere Schimmelpilze wachsen restriktiv, da ihnen nötige Nährstoffe fehlen (OHFF und WEISSBACH, 1984).

2.1.7.2 Toxinnachweis

2.1.7.2.1 MTT-Zellkulturtest

Um die Zytotoxizität von Probenextrakten nachzuweisen, werden häufig biologische Verfahren auf Zellkulturbasis eingesetzt. Diese gehören zu den effect-based bioassays, die wirkungsbezogene Aussagen ermöglichen. Ein solches Verfahren ist der MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Zellkulturtest. Dabei wird die zytotoxische Wirkung eines Extraktes auf die Zellviabilität gemessen, ohne einzelne Toxine zu identifizieren. Je nach Fragestellung kommen unterschiedliche Zelllinien zur Anwendung, wie beispielsweise humane Zervixkarzinomzellen (HeLa-Zellen), humane Lymphozyten oder Schweinenierenzellen (SK-Zellen). Letztere sind verhältnismäßig robust in der Handhabung und gleichzeitig besonders empfindlich gegenüber Mykotoxinen (GAREIS, 1994; GAREIS, 2006).

Das Prinzip dieses Testsystems ist die Messung einer Umsetzung von gelbem

MTT durch mitochondriale Enzyme intakter Zellen. Dabei entstehen violette Formazane (ALTMAN, 1976). Je toxischer eine Substanz ist, desto mehr Zellen gehen bei Inkubation mit dieser Substanz zugrunde oder werden in ihrer metabolischen Aktivität gehemmt, was zu einer geringeren Bildung der Formazankristalle führt. Deren Konzentration kann dann photometrisch bestimmt werden (HANELT et al., 1994). Zur Beurteilung der Ergebnisse wird der IC_{50} -Wert herangezogen. Das ist diejenige Toxinkonzentration, bei der die Bildung von Formazanen im Vergleich zum Kontrollansatz, d.h. nicht gegenüber dem Probenextrakt exponierten Zellen mit 100 % Spaltungsaktivität, um 50 % vermindert ist (GAREIS, 2006).

In Tabelle 7 sind IC_{50} -Werte verschiedener Mykotoxine gegenübergestellt. Hierbei ist die hochgradige Zytotoxizität der makrozyklischen Trichothecene im Vergleich zu anderen Mykotoxinen deutlich ersichtlich (GAREIS, 2006).

Tabelle 7: IC_{50} -Werte verschiedener Mykotoxine im MTT-Test mit swine kidney-Targetzellen (Mittelwerte aus n Messungen) (nach Gareis, 2006)

Mykotoxin	Anzahl Messungen	IC_{50} -Wert ($\mu\text{g/ml}$)
Roridin A	4	0,0010
Verrucarín A	4	0,0054
Satratoxin G	5	0,0073
Satratoxin H	5	0,0146
T-2 Toxin	7	0,0182
Ochratoxin A	21	14,01
Deoxynivalenol	31	16,93
Aflatoxin B1	4	21,88
Alternariol	6	91,67
Verrucarol	3	266,67
Zearalenon	3	>400,00

IC_{50} -Wert (inhibitory concentration 50): Dosis, bei der die Zellviabilität um 50 % abnimmt

2.1.7.2.2 ELISA

Mithilfe des Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA), einem immunchemischen Verfahren, können einzelne Analyten quantitativ oder – je nach Ausprägung von Kreuzreaktionen – Gruppen von Analyten semiquantitativ in Form von Toxinäquivalenten nachgewiesen werden. Bereits 1981 entwickelte PESTKA einen entsprechenden Test für das Typ A-Trichothecen T-2 Toxin, sowie für

Ochratoxin A (PESTKA et al., 1981a; PESTKA et al., 1981b).

Einige Jahre später gelang es MÄRTLBAUER et al. (1988), einen ELISA zum Nachweis makrozyklischer Trichothecene zu entwickeln, der auf der Messung von Roridin A beruht. Roridin A wird dazu mit einem A-Hemisuccinat-Derivat und humanem Serumalbumin gekoppelt und Kaninchen injiziert. Die so gebildeten Antikörper werden als feste Phase des Testsystems verwendet. Die Sensitivität und Spezifität wurden mittels Roridin A-Hemisuccinat-Peroxidase (Enzymkonjugat) überprüft. Aufgrund von Kreuzreaktionen ist mit diesem Test auch der Nachweis von Satratoxin G und H sowie Roridin J und Verrucarin A möglich (Tabelle 8), wobei das Testsystem nicht zwischen den einzelnen Toxinen unterscheiden kann.

Ein kommerzieller Anbieter eines ELISA-Kits basierend auf diesem Testprinzip ist die Firma EnviroLogix Inc. (Maine, USA). Bei dem Envirologix Quantitox™ Kit handelt es sich um einen kompetitiven ELISA, d.h. die in den Extrakten enthaltenen Toxine konkurrieren mit dem im Test enthaltenen, enzymmarkierten Toxin um die Bindungsstellen an den am Boden der Kavitäten fixierten Antikörper. Das enzymmarkierte Roridin A katalysiert eine Farbreaktion des zugegebenen Substrats, d.h. die Farbintensität ist umgekehrt proportional zur Toxinmenge der Extrakte. Mit dem Testkit können verschiedene Probenmatrices (Staub, Wandmaterialien, Luftfilter) auf das Vorhandensein von makrozyklischen Trichothecenen untersucht werden. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,14 ppb (parts per billion) Roridin A-Äquivalent (ANONYMOUS, 2013b).

Tabelle 8: Spezifität der Roridin A - Antikörper und Kreuzreaktionen (nach MÄRTLBAUER et al., 1988)

Toxin	Konzentration, bei der 50 % des Enzymkonjugats binden ($\mu\text{mol/l}$)	Kreuzreaktivität im Vergleich zu Roridin A (%)
Roridin A	0,030	100,0
Roridin J	0,074	40,7
Verrucarin A	0,199	15,1
Satratoxin H	0,208	14,8
Satratoxin G	0,459	6,5
Diacetylverrucarol	19,046	0,15
Verrucarol	60,150	0,05

2.1.7.2.3 LC-MS/MS

Mit physikalisch-chemischen Verfahren wie z. B. der Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) können Toxine und andere, im spurenanalytischen Bereich relevante Substanzen eindeutig identifiziert und quantifiziert werden. Die Kopplung der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit der Massenspektrometrie ermöglicht eine Detektion mit besonders hoher Spezifität und Sensitivität bis in den unteren ppb (parts-per-billion)-Bereich (ng/g Probenmatrix), die notwendig ist, um beispielsweise EU-Höchstmengen für Kontaminanten überwachen zu können (ANONYMOUS, 2006). Der flüssige Probenextrakt, der ein Gemisch aus Matrixbestandteilen und Zielanalyten darstellt, wird mithilfe der HPLC durch unterschiedliche Wechselwirkungen mit dem Fließmittel und der Chromatographiesäule aufgetrennt. Die Retentionszeit des Analyten wird im Abgleich mit entsprechenden Referenzsubstanzen als Identifikationskriterium für die jeweiligen Analyten herangezogen. Die Detektion kann mithilfe von UV- oder Fluoreszenzdetektoren oder mittels Massenspektrometrie erfolgen (LOTTSPREICH et al., 2012).

Bei der LC-MS/MS werden die Analyten in einer Ionenquelle unter hoher Spannung und Temperatur in die Gasphase überführt. Anhand vier parallel verlaufender Stabelektroden (Quadrupol) werden die interessierenden Analyten (Vorläufer-Ionen) anhand ihres Masse/Ladungs-Verhältnisses selektiert und daraufhin mithilfe eines Kollisionsgases fragmentiert. Die entstandenen Produkt-Ionen sind für den jeweiligen Analyten immer spezifisch. Zum eindeutigen Nachweis einer Substanz werden üblicherweise die Signale zweier Massenübergänge (ein Vorläufer-Ion zu zwei Produkt-Ionen oder zwei Vorläufer-Ionen zu je einem Produkt-Ion) herangezogen (ANONYMOUS, 2002b). Die hohe Spezifität dieses Verfahrens wird neben der Retentionszeit durch die Masse der Ausgangssubstanz, deren spezifische Fragmentmassen und durch das Verhältnis der Fragmente zueinander erreicht (LOTTSPREICH et al., 2012).

Es existieren LC-MS/MS-Anwendungen zum quantitativen Nachweis einzelner bzw. Gruppen von Mykotoxinen zur Überwachung der in der EU festgelegten Höchstmengen (ZÖLLNER et al., 1999; RUNDBERGET und WILKINS, 2002; KLÖTZEL et al., 2005; PAEPENS et al., 2005; ANONYMOUS, 2006) bis hin zu Multitoxin-Screeningverfahren für diverse Lebensmittel (XAVIER und SCUSSEL, 2008; SULYOK et al., 2010) und Luftproben (LANIER et al., 2012). NIELSEN et al.

(1998), TUOMI et al. (2000) und BLOOM et al. (2007) verwendeten LC-MS/MS-Systeme zum Nachweis von makrozyklischen Trichothecenen aus Baumaterialien und Hausstaub. Andere LC-MS/MS-Methoden zum Nachweis von makrozyklischen Trichothecenen umfassten keine Satratoxine, sondern nur Roridin A und Verrucarin A (GENTILI et al., 2007; STECHER et al., 2007). Zuletzt wurden LC-MS/MS-Methoden zum Nachweis von Satratoxinen und Roridinen sowohl für Umweltproben (GOTTSCHALK et al., 2006, 2008) als auch für Lebens- und Futtermittel auf Getreidebasis beschrieben (GOTTSCHALK et al., 2009).

2.1.7.3 Genotypischer Nachweis

Die molekularbiologische Diagnostik von *S. chartarum* umfasst verschiedene Ansätze der Polymerasekettenreaktion (PCR) in Kombination mit Sequenzierungen. Definierte Genabschnitte (vgl. Kapitel 2.1.3.) werden hierbei gezielt vermehrt und anschließend sequenziert. Der Vorteil dieser Methode ist, dass das Ergebnis unabhängig von der Toxinexpression eines Isolates ist. Diese kann je nach Wachstumsbedingungen erheblich variieren (NIKULIN et al., 1994), während die genetische Grundlage aufgrund der chromosomalen Codierung immer gleich ist. PELTOLA et al. (2002) entwickelten ein System zur Amplifikation des Tri5-Gens, wobei nicht alle untersuchten *Stachybotrys*-Isolate positiv reagierten. ANDERSEN et al. (2003) sahen als mögliche Ursache dafür, dass die Primer, die PELTOLA et al. verwendeten, an Stellen des Genabschnitts ansetzen, an denen sich zwischen *S. chartarum* und dem später beschriebenen *S. chlorohalonata* Sequenzunterschiede befinden.

HAUGLAND und HECKMAN (1998) fanden heraus, dass sich einzelne Isolate von *S. chartarum* im Bereich der ITS-Region an einer bestimmten Stelle der Sequenz unterschieden. Einige Stämme besaßen an der Stelle 58 des ITS2-Abschnitts (Abschnitt des ITS-Gens) ein Thymin, andere ein Cytosin. Da sich *S. chartarum* auch im Toxinprofil sehr uneinheitlich zeigte, könnte es sich nach Ansicht der Autoren um zwei verschiedene Spezies handeln. CRUSE et al. (2002) entwickelten Primer für drei weitere Genabschnitte (Tri5, Tub2, Chs1). Es stellte sich heraus, dass alle in dieser Studie untersuchten *Stachybotrys*-Isolate das Tri5-Gen besaßen, es jedoch Sequenzunterschiede in allen vier untersuchten Genabschnitten innerhalb der Spezies *S. chartarum* gab. ANDERSEN et al. (2003) untersuchten 25 Isolate aus früheren Studien sowohl morphologisch als

auch auf ihr Toxinprofil und sequenzierten die bereits von CRUSE et al. (2002) beschriebenen Genabschnitte. Diese Untersuchungen führten zur Beschreibung von *S. chlorohalonata*, der in enger Verwandtschaft zu *S. chartarum* steht, jedoch in allen vier Genabschnitten (ITS, Tri5, Tub2 und Chs1) definierte Sequenzunterschiede zu diesem aufzeigt (vgl. Kapitel 2.1.3).

2.2 Gewürze

Laut den Leitsätzen für Gewürze und andere würzende Zutaten handelt es sich bei Gewürzen um Blüten, Früchte, Knospen, Samen, Rinden, Wurzeln, Wurzelstöcke, Zwiebeln oder Teile davon, die meist in getrockneter Form, aufgrund ihres Gehalts an geschmack- bzw. geruchgebenden natürlichen Inhaltsstoffen als Lebensmittelzutaten verwendet werden. Kräuter sind frische oder getrocknete Blätter, Blüten, Sprosse oder Teile davon (ANONYMOUS, 1998).

Tabelle 9 zeigt die Einteilung von Gewürzen nach Pflanzenteilen.

Tabelle 9: Einteilung der Gewürze nach Art des Rohmaterials, aus dem sie gewonnen werden (GERHARDT, 1994)

Gruppenbezeichnung	Lateinische Bezeichnung	Beispiele
Samen und Früchte	Semina, Fructus	Muskatnuss, Paprika, Pfeffer, Senf
Kräuter und Blätter	Herba, Folia	Basilikum, Lorbeer, Majoran, Rosmarin
Wurzeln und Wurzelstöcke	Radices, Rhizomata	Curcuma, Ingwer
Blüten und -teile	Flores	Kümmel, Koriander, Gewürznelken, Safran
Zwiebeln	Bulbi	Knoblauch, Zwiebel
Rinden	Cortices	Zimt

Gewürze sind ein wichtiger Bestandteil der Ernährung und Lebensmittelproduktion. Bereits in der Antike importierten arabische Kaufleute die kostbaren Luxusgüter, die hauptsächlich aus Indien stammten, nach Ägypten und von dort weiter nach Europa. Auch heute stammt ein Großteil der Gewürze aus dem asiatischen Raum, vor allem Pfeffer und Paprika. Im Jahr 2011 lag in Deutschland der Gesamtimport an Gewürzen bei 94.303 Tonnen, was einem Gesamtwert von

rund 337 Mio. Euro entsprach. Hierbei liegt Pfeffer mit 25.483 Tonnen an erster Stelle, gefolgt von Paprika mit 11.991 Tonnen. Der Inlandsverbrauch von Gewürzen lag im Jahr 2011 bei 61.618 Tonnen. Zum Import und Verbrauch von Kräutern, und speziell zu den in dieser Arbeit untersuchten Kräutern Majoran, Oregano, Thymian und Bohnenkraut gibt es leider nur unzureichende Angaben, da diese unter „Sonstige“ zusammengefasst wurden (Tabelle 10) (ANONYMOUS, 2013e).

Tabelle 10: Import von Gewürzen nach Deutschland im Jahr 2011 (nach ANONYMOUS, 2013e)

Gewürz	Menge in Tonnen	Wert in 1000 Euro
Pfeffer	25.483	118.354
Paprika	11.991	29.932
Zimt	3.214	5.503
Nelken	712	4.098
Muskat	1.718	19.675
Macis	347	7.041
Cardamom	571	8.470
Koriander	4.200	3.765
Kümmel	2.915	5.187
Ingwer	10.567	26.623
Sonstige	32.585	108.328

Der Gewürzhandel in Deutschland liegt zu ca. 75 % in der Hand der Fuchs Gewürze GmbH & Co (Dissen) und ihrer Tochterunternehmen (Fuchsgruppe). Diese ist somit der größte Gewürzunternehmer in Europa (ANONYMOUS, 2013f). Die Firma Fuchs erwarb seit 1998 die Firmen Ostmann, UBENA und Wagner. Außerdem vertreibt Fuchs auch Gewürze der Firmen Weiland, Aso, Columbia, Portland, Kania, Carat, Timbu, Basra, gut & billig, Tip, Pirkka und Prorest (ANONYMOUS, 2002a, 2010).

Der übrige Gewürzmarkt in Deutschland wird von kleinen und mittelständischen Unternehmen abgedeckt, die z.T. deutschlandweit, zumeist aber regional begrenzt ihre Produkte vertreiben (ANONYMOUS, 2002a).

2.2.1 Herkunft und Eigenschaften von getrockneten Kräutern

Die in dieser Arbeit untersuchten getrockneten Kräuter werden hauptsächlich in den Mittelmeer- und Balkanländern, aber auch in Ägypten und Deutschland angebaut (Tabelle 11), gehören zur Familie der Lippenblütler (*Lamiaceae*) (Abbildung 8) und besitzen aufgrund ihres Gehaltes an ätherischen Ölen sowohl würzenden als auch verdauungsfördernden Charakter.

Tabelle 11: Übersicht über die Kräuter Majoran, Oregano, Thymian und Bohnenkraut (nach SALZER und SIEWEK, 2012)

	Majoran	Oregano	Thymian	Bohnenkraut
Wissenschaftlicher Name	<i>Origanum majorana</i> L.	<i>Origanum vulgare</i> L.	<i>Thymus vulgaris</i> L.	<i>Satureja hortensis</i> L.
Herkunft/Anbaubiete	Europa (v. a. Deutschland) Nordafrika (v. a. Ägypten)	Mittel- und Südeuropa, Skandinavien, Rußland	Mittel- und Südeuropa, Rußland, Balkan, Marokko	Europa, Balkan, Rußland, Iran, Indien, Südafrika
Verwendete Teile	Blätter, Blüten	Blätter, Blüten, Stengel	Blätter, Blüten, Stengel	Blätter, Blüten, Stengel
Erntezeit	Kurz vor oder während der Blütezeit (Juni-September)	Während der Blütezeit (Juli-September)	Kurz vor oder während der Blütezeit (Juni-September)	Während der Blütezeit (Juli-Oktober)
Verwendung	Fleisch, Kochwürste, Suppen, Saucen, Salate, Pilze, Pizza, Fisch, Eintopf	Pizza, Tomatengerichte, Fleisch, Fisch, Suppen, Kartoffelgerichte, Gemüse	Fleisch, Wurst, Fisch, Pilze, Hülsenfrüchte, Kartoffeln, Saucen, Gemüse, Eintöpfe	Bohnen-, Linsen- und Erbsengerichte, Fisch, Fleisch, Gemüse, Salat, Suppen

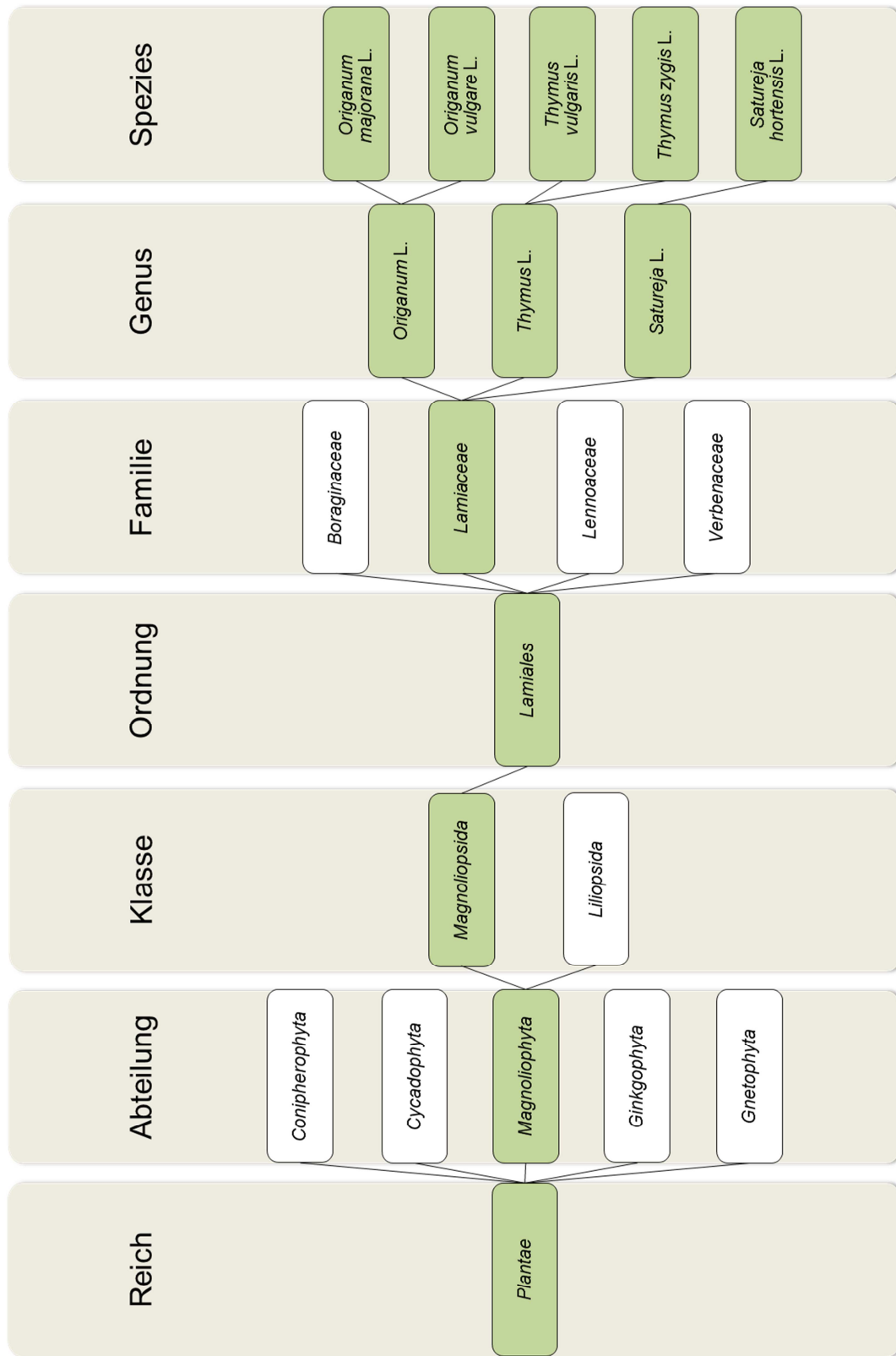


Abbildung 8: Taxonomische Einordnung der Kräuter Majoran, Origanum, Thymian und Bohnenkraut im Reich der Pflanzen (ANONYMOUS, 2013a). Die taxonomische Zuordnung ist grün markiert.

2.2.1.1 Majoran

Bei Majoran handelt es sich um die getrockneten, gerebelten Laubblätter und Blütenstände von *Origanum majorana* L. (ANONYMOUS, 1998). Die Pflanze kommt ursprünglich aus Indien, hat sich aber über Ägypten und Europa verbreitet und kommt heute weltweit vor. Abbildung 9 zeigt eine typische Majoranpflanze zur Blütezeit und das fertige, gerebelte Gewürz.

Das größte Anbaugebiet Europas findet sich in Aschersleben in Deutschland. Majoran wird kurz vor oder während der Blütezeit geerntet und findet vor allem in Wurst- und Fleischgerichten Verwendung (Tabelle 11) (SALZER und SIEWEK, 2012).



Abbildung 9: Majoran, Pflanze (VAN WYK, 2005) und gerebeltes Gewürz (eigene Aufnahme)

2.2.1.2 Oregano

Unter Oregano versteht man die getrockneten, meist gerebelten Laubblätter sowie die Blüten und obersten Stengelteile von *Origanum vulgare* L. (ANONYMOUS, 1998). Er ist ein enger Verwandter des Majoran und in Südeuropa heimisch. Oregano wird während der Blütezeit von Juli bis September geerntet und ist ein bedeutendes Gewürz der mediterranen Küche. Er dient vor allem zur Verfeinerung von Tomaten-, Fleisch- und Fischgerichten, aber auch von Salaten, Kartoffeln und Gemüse (Tabelle 11) (SALZER und SIEWEK, 2012). Abbildung 10 zeigt eine typische Oreganopflanze zur Blütezeit und das fertige, gerebelte Gewürz.



Abbildung 10: Oregano, Pflanze (VAN WYK, 2005) und gerebeltes Gewürz (eigene Aufnahme)

2.2.1.3 Thymian

Bei Thymian (Abbildung 11) unterscheidet man zwei Arten, die als Gewürz verarbeitet werden, *Thymus vulgaris* L. und *Thymus zygis*. Verwendet werden die getrockneten Laubblätter und Blüten der ebenfalls zur Familie der *Lamiaceae* zählenden Pflanzen (ANONYMOUS, 1998). Thymian kommt ebenfalls aus Südeuropa, wird aber weltweit angebaut und kurz vor oder während der Blüte geerntet. Er findet vor allem in der französischen Küche als Würze für Fleisch und Fleischwaren, Fisch und Kartoffelgerichte Verwendung (Tabelle 11) (SALZER und SIEWEK, 2012).



Abbildung 11: Thymian, Pflanze (VAN WYK, 2005) und gerebeltes Gewürz (eigene Aufnahme)

2.2.1.4 Bohnenkraut

Auch bei Bohnenkraut (*Satureja hortensis* L.) (Abbildung 12) finden die getrockneten, gerebelten Laubblätter als Gewürz Verwendung (ANONYMOUS, 1998). Die Pflanze stammt aus dem östlichen Mittelmeerraum und ist heute in ganz Europa heimisch. Die Ernte erfolgt wiederum kurz vor oder während der Blütezeit. Bohnenkraut eignet sich besonders zum Würzen von Bohnengerichten, aber auch Fleisch- und Fischgerichte lassen sich damit verfeinern (Tabelle 11) (SALZER und SIEWEK, 2012).



Abbildung 12: Bohnenkraut, Pflanze (VAN WYK, 2005) und gerebeltes Gewürz (eigene Aufnahme)

2.2.2 Verarbeitung von Gewürzen

Da die Qualität der Rohstoffe von verschiedenen Faktoren wie Anbauverfahren, Erntezeitpunkt, Ernteverfahren und Wettereinflüssen abhängt, werden sie zunächst einer Qualitätskontrolle unterzogen (SCHWEIGGERT et al., 2007; ANONYMOUS, 2013d). Die weitere Verarbeitung hängt von der Art des Gewürzes ab, folgt jedoch gewissen Grundsritten. Das geerntete Material wird zunächst getrocknet, was in Abhängigkeit von der Herkunft des Materials entweder direkt vor Ort in der Sonne oder maschinell geschieht. Anschließend wird das getrocknete Pflanzenmaterial gereinigt und je nach Gewürzart durch Mahlen oder Rebeln zerkleinert, gesiebt und verpackt (SCHWEIGGERT et al., 2007).

Da Gewürze als Naturprodukte und aufgrund ihrer Herstellung (Wachstum in Bodennähe, Trocknung auf dem Boden etc.) eine hohe Keimbelastung aufweisen können, besteht die Gefahr eines Eintrags in die Endprodukte. Wenn die Keime aus dem trockenen Gewürz in ein Lebensmittel mit höherem a_w -Wert gelangen, finden sie optimale Bedingungen für Wachstum und Vermehrung. Das kann vor allem in ready-to-eat-Produkten, wie z.B. Rohwurst, gesundheitliche Gefahren bergen, da diese vor dem Verzehr nicht erneut erhitzt werden (LITTLE et al., 2003; WEBER, 2003). Deshalb werden Gewürze häufig einer keimreduzierenden Behandlung unterzogen (SCHWEIGGERT et al., 2007).

Eine Möglichkeit ist die Bestrahlung von getrockneten, aromatischen Kräutern und Gewürzen mit Gammastrahlen, Röntgenstrahlen oder Elektronenstrahlen. Diese ist bei einer maximalen Gesamtdosis von 10 kGy eine in der EU zugelassene Methode (ANONYMOUS, 2011b). Strahlendosen von 3-10 kGy sind ausreichend um die mikrobiologische Sicherheit des Produktes zu erhöhen (NIETO-SANDOVAL et al., 2000). Die Verpackungen der Gewürze müssen dafür speziell geeignet sein und die Produkte entsprechend gekennzeichnet werden (ANONYMOUS, 2011b). Da eine derartige Behandlung der Produkte von den Verbrauchern jedoch nicht toleriert wird, wird diese Methode nur selten angewandt (SCHWEIGGERT et al., 2007).

Das derzeitige Verfahren der Wahl in Deutschland ist die Dampfentkeimung (WEBER, 2003). Hierbei werden die Gewürze mit Satt- oder überhitztem Wasserdampf behandelt, was zu einer ausreichenden Keimreduktion führt. Im Vergleich zur Bestrahlung kommt es bei dieser Methode jedoch zu deutlichen Farb- und Aromaverlusten (WEBER, 2003), da die Gewürze hoher Feuchtigkeit ausgesetzt werden. Diese muss nach der Entkeimung aufwendig wieder entfernt werden, da das Produkt sonst erneut zu Schimmelbildung neigt (SCHWEIGGERT et al., 2007).

2.2.3 Mikrobiologischer Status von getrockneten Kräutern

Für Gewürze existieren Richt- und Warnwerte der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM). Danach liegt der Richtwert für das Vorkommen von Schimmelpilzen in getrockneten Kräutern und Gewürzen bei 10^5 KbE/g. Dieser Wert stellt jedoch keine verbindliche Rechtsnorm dar, sondern dient vielmehr der Orientierung für die Lebensmittelunternehmen. Ein Warnwert

für Schimmelpilze in Gewürzen existiert nicht (ANONYMOUS, 2011a).

Für die in dieser Arbeit untersuchten Kräuter finden sich nur wenige Daten zum Status einer mykogenen Keimbelastung. Diese liegt mit Werten von $<10^2$ - $1,0 \times 10^5$ KbE/g immer unterhalb des Richtwerts der DGHM (Tabelle 12). Zum Vorkommen einzelner Schimmelpilzgattungen in den vier Kräuterarten sind keine Literaturangaben zu finden.

Tabelle 12: Mikrobielle Belastung von ausgewählten Kräutern

Gewürz	Mesophile GKZ	Schimmelpilze	Quelle
Majoran	$5,0 \times 10^5$ KbE/g	Keine Angabe	BAXTER und HOLZAPFEL (1982)
	$10^4 - 10^5$ KbE/g	$5,6 \times 10^2$ KbE/g	GRAUBAUM et al. (2005)
	$10^3 - 10^6$ KbE/g	Keine Angabe	HAMMON (2008)
Oregano	$10^4 - 10^7$ KbE/g	Keine Angabe	KNEIFEL und BERGER (1994)
	$>10^6$ KbE/g	$1,0 \times 10^5$ KbE/g	GRAUBAUM et al. (2005)
Thymian	$1,2 \times 10^5$ KbE/g	Keine Angabe	BAXTER und HOLZAPFEL (1982)
	10^2 - 10^3 KbE/g	$< 10^2$	GRAUBAUM et al. (2005)
Bohnenkraut	10^2 - 10^3 KbE/g	$4,0 \times 10^2$ KbE/g	GRAUBAUM et al. (2005)

GKZ: Gesamtkeimzahl, KbE/g: Koloniebildende Einheiten pro Gramm

2.2.4 Gewürze aus ökologischer Produktion

Die Produktion von Bio-Gewürzen ist in der EG-Öko-Basisverordnung (VO (EG) 834/2007) geregelt (ANONYMOUS, 2007). Es gelten strenge Regelungen für den Anbau von ökologisch erzeugten pflanzlichen Lebensmitteln. So muss das Saatgut aus biologischer Erzeugung stammen, es dürfen nur speziell zugelassene Dünge- und Pflanzenschutzmittel verwendet werden und Bodenbearbeitungs- und Anbauverfahren müssen so gewählt werden, dass die organische Bodensubstanz erhalten oder vermehrt, die Bodenstabilität und die biologische Vielfalt im Boden verbessert und Bodenverdichtung und Bodenerosion verhindert wird.

Außerdem ist das Verbot der ionisierenden Strahlung für ökologische Lebensmittel in dieser Verordnung enthalten. Eine Dekontamination darf nur mittels thermischer Verfahren stattfinden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Kräuter

In einer orientierenden Studie wurden zunächst ausschließlich Majoranproben für die Untersuchung gewählt. Verwendet wurden dazu $n = 20$ Proben von Majoran unterschiedlicher Herkunft und Erzeugungsweise (Tabelle 13).

Tabelle 13: Hersteller und Anzahl der im Rahmen einer orientierenden Studie untersuchten Majoranproben ($n = 20$)

	Hersteller	Anzahl Proben (Konventionell)	Anzahl Proben (Ökologisch)
Fuchsgruppe	Fuchs Gewürze GmbH (Dissen)	3	-
	Ostmann Gewürze GmbH (Dissen)	4	-
	Wagner Gewürze GmbH (Dissen)	2	5
	Kania Spices (Lidl, Neckarsulm)	2	-
Sonstige	H.E.S GmbH (Bad Dürrenberg)	1	-
	Henosa Asiatic (Bellenberg)	1	-
	Mawea GmbH (Aschersleben)	1	-
	BioBio (Bayreuth)	-	1

Im Anschluss daran wurden neben Majoran drei weitere Kräuterarten – Oregano, Thymian und Bohnenkraut – miteinbezogen. Von jeder der vier Kräuterarten wurden je zehn konventionell und zehn ökologisch erzeugte Produkte gewählt (Tabelle 14). Alle Proben waren im Handel bzw. über das Internet in typischen Angebotsformen erhältlich (Abbildung 13) und befanden sich zum Zeitpunkt der Untersuchung innerhalb des Mindesthaltbarkeitsdatums.

Die Auswahl der Hersteller richtete sich nach deren Marktanteil. Hierbei bildete die Fuchsgruppe mit den Marken Fuchs, Ostmann und Wagner mit 70 % den Hauptanteil. Es wurde darauf geachtet, dass sich Produkte vom gleichen Hersteller in der Chargennummer unterschieden. Die Herkunft des Rohmaterials, der Erntezeitpunkt und die Klimabedingungen zum Erntezeitpunkt wurden bei der Auswahl nicht berücksichtigt.

Tabelle 14: Hersteller und Anzahl der untersuchten Proben (je n = 20 für Majoran, Oregano, Thymian und Bohnenkraut)

	Hersteller	Anzahl Proben (n = 10 konventionell)	Anzahl Proben (n = 10 ökologisch)
Fuchsgruppe	Fuchs Gewürze GmbH (Dissen)	2	-
	Ostmann Gewürze GmbH (Dissen)	3	-
	Wagner Gewürze GmbH (Dissen)	2	7
Sonstige	Ulrich Walter GmbH/Lebensbaum (Diepholz)	-	1
	Gewürzmühle Brecht GmbH (Eggenstein)	-	1
	Kräuterreich Online Shop (Stein-Wingert)	-	1
	H.E.S GmbH (Bad Dürrenberg)	1	-
	Henosa Asiatic (Bellenberg)	1	-
	Raps GmbH & Co KG (Kulmbach)	1	-

**Abbildung 13:** Typische Angebotsformen der im Handel erhältlichen Kräuter

3.1.2 Referenzstämme

Als Referenzstämme wurden Isolate aus der Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie und Biotechnologie am Max Rubner-Institut (MRI) Kulmbach und aus der Stammsammlung des BioCentrum der Technischen Universität Dänemark (DTU), Lyngby, Dänemark, ausgewählt. Dabei handelte es sich um je zwei Isolate *S. chartarum* Chemotyp A, *S. chartarum* Chemotyp S und *S. chlorohalonata* (Tabelle 15).

Tabelle 15: *Stachybotrys*-Isolate, die als Referenzstämme verwendet wurden

Spezies	Stamm-Nr.	Isoliert aus/Herkunft	Stammsammlung
<i>S. chartarum</i> Chemotyp S	IBT40293	Baumaterial/Kalifornien (USA)	BioCentrum-DTU, Lyngby, Dänemark
<i>S. chartarum</i> Chemotyp S	S1114	Rigips/Kalifornien (USA)	MRI Kulmbach
<i>S. chartarum</i> Chemotyp A	IBT40288	Baumaterial/Dänemark	BioCentrum-DTU, Lyngby, Dänemark
<i>S. chartarum</i> Chemotyp A	S1091	Rigips/South Carolina (USA)	MRI Kulmbach
<i>S. chlorohalonata</i>	IBT40285	Baumaterial/Kalifornien (USA)	BioCentrum-DTU, Lyngby, Dänemark
<i>S. chlorohalonata</i>	S7	Stroh/Bayern (Deutschland)	MRI Kulmbach

3.1.3 Vergleichssequenzen

Als Vergleichssequenzen für die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse wurden Sequenzen aus der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) verwendet (Tabelle 16). Für die Genabschnitte ITS und Tub2 wurde jeweils eine Vergleichssequenz für *S. chartarum* und eine für *S. chlorohalonata* ausgewählt, da hier nur eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Spezies möglich ist (vgl. Kapitel 2.1.3). Bei den Genabschnitten Tri5 und Chs1 waren jeweils drei Vergleichssequenzen nötig (*S. chartarum* Chemotyp A, *S. chartarum* Chemotyp S und *S. chlorohalonata*), weil bei diesen Genabschnitten zusätzlich zur Speziesdifferenzierung auch zwischen *S. chartarum* Chemotyp A und Chemotyp S unterschieden werden kann (vgl. Kapitel 2.1.3).

Tabelle 16: Vergleichssequenzen der NCBI-Datenbank (ANONYMOUS, 2012)

Spezies	Genabschnitt	GenBank-Nummer	Literatur
<i>S. chartarum</i>	ITS	AF081469.1	HAUGLAND und HECKMAN (1998)
<i>S. chlorohalonata</i>	ITS	AF081468.2	HAUGLAND und HECKMAN (1998)
<i>S. chartarum</i>	Tub2	AF468156.1	CRUSE et al. (2002)
<i>S. chlorohalonata</i>	Tub2	AF468157.1	CRUSE et al. (2002)
<i>S. chartarum</i> Chemotyp S	Tri5	EU288836.1	SELKE und FLORIDA (2007)
<i>S. chartarum</i> Chemotyp A	Tri5	AF468154.1	CRUSE et al. (2002)
<i>S. chlorohalonata</i>	Tri5	AF468155.1	CRUSE et al. (2002)
<i>S. chartarum</i> Chemotyp S	Chs1	EU288798.1	SELKE und FLORIDA (2007)
<i>S. chartarum</i> Chemotyp A	Chs1	AF468158.1	CRUSE et al. (2002)
<i>S. chlorohalonata</i>	Chs1	AF468159.1	CRUSE et al. (2002)

3.1.4 Toxin-Referenzsubstanzen

Im Zellkulturtest wurde Roridin A (Sigma-Aldrich, Steinheim) als Positivkontrolle mitgeführt. Das Testkit für den Trichothecen-ELISA (Envirologix Quantitox™ Kit for Trichothecenes, Maine, USA) enthielt ebenfalls Roridin A als Standardsubstanz. Satratoxin G und H für die LC-MS/MS-Analyse waren nicht käuflich erhältlich. Sie stammten aus der institutseigenen Toxinsammlung (GAREIS, 2013). Roridin A und Verrucarin A wurden für diese Untersuchung über Sigma-Aldrich bezogen.

3.1.5 Nährmedien

In Tabelle 17 sind die für die mykologischen Untersuchungen benötigten Nährmedien mit ihrer Zusammensetzung aufgelistet.

Tabelle 17: Art und Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Menge	Hersteller/Artikelnummer
Malzextraktagar (MEA)	Fertigmischung	48,0 g	Merck, Art.-Nr. 105398
Aqua dest.	.	ad 1000 ml	
Malzextraktagar mit Antibiotikum (MEA ⁺)	Fertigmischung	48,0 g	Merck, Art.-Nr. 105398
Novobiocin		0,125 g	Sigma-Aldrich, Art.-Nr. N-1628
Aqua dest.		ad 1000 ml	
Dichloran-Glycerin-Agar (DG-18)	Fertigmischung	31,6 g	Merck, Art.-Nr. 100465
Glycerin		220,0 g	AppliChem, Art.-Nr. A3552
Aqua dest.		ad 1000 ml	
Nährmedium nach OHFF und WEISSBACH (OF):	KH ₂ PO ₄	0,5 g	Merck, Art.-Nr. 104873
	NaNO ₃	0,5 g	Merck, Art.-Nr. 106537
	NaCl	0,1 g	AppliChem, Art.-Nr. A4857
	Aqua dest.	ad 1000 ml	
Nährmedium nach VAN ITERSON (IT):	NH ₄ NO ₃	0,5 g	Merck, Art.-Nr. 101187
	KH ₂ PO ₄	0,5 g	Merck, Art.-Nr. 104873
	Aqua dest.	ad 1000 ml	
Peptonwasser 1 %:	Universalpepton	1,0 g	Merck, Art.-Nr. 107043
	Tween 80	1,0 g	Merck-Schuchardt, Art.-Nr. 822187
	NaCl	8,0 g	AppliChem, Art.-Nr. A4857
	Aqua dest.	ad 1000 ml	
Magermilch 10 %:	Magermilch	100,0 g	Merck, Art.-Nr. 115363
	Aqua dest.	ad 1000 ml	

3.1.6 Materialien und Geräte zur phänotypischen Untersuchung

- Aceton z.A. [Merck, Art.-Nr. 100014]
- Aluminium-Bördelkappen für Ganzabriss [Macherey & Nagel, Art.-Nr. 702805]
- Ammoniumnitrat [Merck, Art.-Nr. 101187]
- Anilinblau wasserlöslich [Merck, Art.-Nr. M 101275]
- Aqua dest.
- Autoklav [Fedegari, Integra Biosciences, Gerätetyp FVA2/A1]
- CPD 030 Critical Point Dryer [Balzers]
- Deckeltubus novus [VWR, Art.-Nr. 467-1254]

- Deckgläser 24 x 24 mm [Merck, Art.-Nr. 613F9415]
- Dispensiergerät „Dose-it 803“ [Integra Biosciences, Seriennr. 1666]
- DRIGALSKI-Spatel [Merck, Art.-Nr. 321G2186]
- Elektronenmikroskop S3000N [Hitachi]
- Erlenmeyerkolben 50 ml [VWR, Art.-Nr. 214-1104]
- Ethylenglycolmonoethylether z.A. [Merck, Art.-Nr. 895]
- Exsikkatordeckel [VWR, Art.-Nr. 467-1290]
- Exsikkatordeckel 150 mm [VWR, Art.-Nr. 467-1275]
- Exsikkatorplatte Porzellan 280 mm [VWR, Art.-Nr. 467-0104]
- Exsikkatorplatte Porzellan 90 mm [VWR, Art.-Nr. 467-0100]
- Exsikkatorunterteil 153 x 112 mm [VWR, Art.-Nr. 467-1110]
- Exsikkatorunterteil ohne Anschluss, 380 x 283 mm [VWR, Art.-Nr. 467-1130]
- Gefriertrocknungsanlage „Alpha 2-4“ [Christ, Typ 100402]
- Gefriertrocknungsstopfen [Macherey & Nagel, Art.-Nr. 702N20GT]
- Glaspipetten 1 ml [VWR, Art.-Nr. 612-1126]
- Glutardialdehyd 25 % Lösung in Wasser [Merck, Art.-Nr. 820603]
- Glycerin [AppliChem, Art.-Nr. A3552]
- Immersionsöl nach DIN für die Mikroskopie [Merck, Art.-Nr. M 104699]
- Impflanzette [VWR, Art.-Nr. 631-7121 N]
- Impfösenhalter Aluminium mit PVC 150 mm [VWR, Art.-Nr. 612-2683]
- Kapsenbergkappen [VWR, Art.-Nr. 391-0911]
- Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator (Orange) [Merck, Art.-Nr. 1.01969]
- Klebeband kristallklar 15 mm [TesaFilm, Art.-Nr. 57316-00000]
- Kohlendioxid UN 1013 [Kohlensäurewerk Hölle, Art.-Nr. 3130]
- Leit-C nach Göcke [Neubauer Chemikalien]
- Lichtmikroskop Leica Orthoplan [Leitz]
- Löffelspatel [Merck, Art.-Nr. 231G1313]
- Messkolben 1000 ml [VWR, Art.-Nr. 612-3565]
- Metall-Impföse 3 mm [VWR, Art.-Nr. 612-2669]
- Milchsäure 90 % [Merck, Art.-Nr. M100366]
- Nährbodenflaschen 1 l / 2,5 l [VWR, Art.-Nr. 391-0528/391-0530]
- Objektträger 76 x 26 mm, geputzt mit Mattrand [Menzel, Art.-Nr. 021102]
- Pasteurpipetten 150 mm [VWR, Art.-Nr. 612-1701]
- Petrischalen Greiner Ø 94 mm [VWR, Art.-Nr. 391-3662]
- Pinzette [Merck, Art.-Nr. 232G2164]
- Pipettierhilfe „accu-jet“ [Brand, Art.-Nr. 26400]
- Präpariernadel [VWR, Art.-Nr. 631-7152]
- Reagenzgläser 20 ml [VWR, Art.-Nr. 212-1118]
- Rollrand-Flaschen N20-5 Din, farblos [Macherey & Nagel, Art.-Nr. 70204.36]
- Rundfilter Schwarzband Ø 70 mm [Schleicher & Schuell, Art.-Nr. 300 008]
- Schere [VWR, Art.-Nr. 2331551]
- Schraubverschlußflaschen 50 ml [VWR, Art.-Nr. 215-1513]
- Stereomikroskop Plan 1x, 50-fache Vergrößerung [Wild Heerbrugg]
- Stomacher 400 [Seward]
- Stomacherbeutel 400 ml 19 x 30 cm BBag [VWR, Art.-Nr. 129-9868]
- Universalpepton [Merck, Art.-Nr. 107043]
- Waage [Sartorius]

3.1.7 Materialien und Geräte zur Untersuchung auf Toxinbildung

3.1.7.1 Toxinextraktion

- Chloroform [VWR, Art.-Nr. 22711.324]
- Dispensette „Organic variable“, Brand [VWR, Art.-Nr. 613-4441]
- Faltenfilter 18,5 cm [Macherey&Nagel, Art.-Nr. 531018]
- Kulturröhrchen, Gewinde mit PP-Schraubkappen, GL 18 [VWR, Art.-Nr. 391-0145]
- Natriumsulfat wasserfrei [Merck, Art.-Nr. 106649]
- Omnifix 2 ml Luer Lock Spritzen [VWR, Art.-Nr. 612-2893]
- Pasteurpipetten 150 mm [VWR, Art.-Nr. 612-1701]
- Pipetten 10 ml [VWR, Art.-Nr. 612-1114]
- Pipetten 2 ml [VWR, Art.-Nr. 612-1109]
- Pipettierhilfe „accu-jet“ [Brand, Art.-Nr. 26400]
- Reagenzglasschüttler „Vortex Genie 2“ [VWR, Art.-Nr. 444-5900]
- Rotationsverdampfer „Rotavapor EL“ [Büchi, Nr.181171]
- Rundkolben 500 ml [VWR, Art.-Nr. 201-1329]
- Siegelrandbeutel 170 x 260 PA/PE20/70 [Metzgergenossenschaft Bayreuth, Art.-Nr. SR11171]
- Siegelrandbeutel 220 x 320 PA/PE90 [Metzgergenossenschaft Bayreuth, Art.-Nr. SR11212]
- Spritzenfilter (Nylon), 25 mm/0,45 µm [Carl Roth, Art.-Nr. E256.1]
- Stickstoff flüssig tiefgekühlt UN 1977 [Riesner Gase, Art.-Nr. LIN]
- Stomacher 400 [Seward]
- Ultraschallbad „Sonorex RK100“ [Bandelin, Gerätenr. 301209289]
- Waage [Sartorius]
- Wasserbad „TW8“ [Julabo]

3.1.7.2 MTT-Zellkulturtest

- 8-Kanalpipette 20-300 µl Eppendorf Research pro [VWR, Art.-Nr. 613-3626]
- 8-Kanalpipette 50-1200 µl Eppendorf Research pro [VWR, Art.-Nr. 613-3628]
- 96-Loch-Mikrotiterplatten Nunclon™ Surface [Nunc, Art.-Nr. 67008]
- CO₂-Brutschrank Typ Hera cell [Heraeus, Art.-Nr. 510 13568]
- Dimethylsulfoxid DMSO [Merck, Art.-Nr. 1.02952]
- Dulbecco's PBS (Phosphate Buffered Saline): 10 x 1l [Sigma, Art.-Nr. D5652]
- ELISA-Reader [Arthos 2010]
- Ethanol [Merck, Art.-Nr. 100983]
- Fötale Kälberserum (FKS) [PAN Biotech, Art.-Nr. 3302-P220503]
- Mikroskop Modell IMT-2 [Olympus]
- Minimum Essential Medium Eagle MEM [Sigma, Art.-Nr. M-4655]
- Plattenschüttler [Titertek]
- Roridin A [Sigma-Aldrich, Art.-Nr. R7502]
- Standardpipettenspitzen 1000 µl [Eppendorf, Art.-Nr. 0030015.002]
- Standardpipettenspitzen 300 µl [Eppendorf, Art.-Nr. 0030001.468]
- Swine Kidney-Zellen [Max Rubner-Institut, Zellkultursammlung]
- Thiazolyl BlueTetrazolium Bromide [Sigma, Art.-Nr. M5655]
- Trypsin-EDTA Solution 10 x [Sigma, Art.-Nr. T4174]
- Ultraschallbad „Sonorex RK100“ [Bandelin]
- Zellkulturflaschen Nunclon™ Surface [Nunc, Art.-Nr. 159910]

3.1.7.3 Trichothecen-ELISA

- Combitips® plus, unsteril, 2,5 ml [VWR, Art.-Nr. 613-3521]
- Combitips® plus, unsteril, 5 ml [VWR, Art.-Nr. 613-3522]
- ELISA Reader „Expert 96“ [ASYS, Art.-Nr. GO18065]
- Envirologix Quantitox™ Kit for Trichothecenes [Envilab, EP-100 Chargen-Nr: 212701 (haltbar bis 30.6.12) Chargen-Nr. 080111 (haltbar bis 31.10.11)]
- Glaspipetten 10 ml [VWR, Art.-Nr. 612-1114]
- Pipette 100 µl „Pipetman P100“ [Gilson, Art.-Nr. F123615]
- Pipette 1000 µl „Pipetman P1000“ [Gilson, Art.-Nr. F123602]
- Pipette 20 µl „Pipetman P20“ [Gilson, Art.-Nr. F123600]
- Pipettenspitzen „Diamond D1200“ Tips (100-1200 µl) [Gilson, Art.-Nr. F161101]
- Pipettenspitzen „Diamond D200“ Tips (2-200 µl) [Gilson, Art.-Nr. F161931]
- Pipettierhilfe „accu-jet“ [Brand, Art.-Nr. 26400]
- Reagenzglasschüttler „Vortex Genie 2“ [VWR, Art.-Nr. 444-5900]
- Reaktionsgefäße 2 ml [Eppendorf, Art.-Nr. 0030120.094]
- Repetierpipette „Multipette® plus“, Eppendorf [VWR, Art.-Nr. 613-3669]
- Schüttler „Thermomixer Comfort“ [Eppendorf]
- Software „Ridasoft Win“ Version 1.73 [R-Biopharm]
- Ultraschallbad „Sonorex RK100“ [Bandelin, Gerätenr. 301209289]
- Washer [Tecan Columbus]
- Zentrifuge „Biofuge pico“ [Heraeus, Art.-Nr. 75003280]

3.1.7.4 LC-MS/MS

- Ameisensäure [Merck, Art.-Nr. 1.00264]
- Ammoniumformiat [Sigma, Art.-Nr. F2004]
- Bördelkappen N11-L, 13 mm [Zefa Laborservice, Art.-Nr. 70288]
- Einmalspritzen Omnifix 2 ml Luer-Lock, Braun [VWR, Art.-Nr. 612-0121]
- HPLC-Anlage PE Series 200 [Perkin-Elmer]
- HPLC-Säule TriArt C18, 150 x 3 mm, 3 µm [YMC, Art.-Nr. TA12503-1503WT]
- Methanol [Merck, Art.-Nr. 1.06009]
- Öffnungszange für Bördelkappen 13 mm [Zefa Laborservice, Art.-Nr. 12967]
- Reinstwasser
- Roridin A [Sigma-Aldrich, Art.-Nr. R7502]
- Software Analyst 1.5.1
- Spritzenfilter (Nylon), 13 mm/0,45 µm [bgb-analytik, Art.-Nr. 101214042]
- Tandemmassenspektrometer „API 3200“ [ABSciex]
- Verrucaridin A [Sigma-Aldrich, Art.-Nr. V4877]
- Verschließzange für Bördelkappen 13 mm [Zefa Laborservice, Art.-Nr. 735113]
- Vials 2 ml 12 x 32 mm Klarglas [Zefa Laborservice, Art.-Nr. 8251370]
- Vorsäule C18, ODS, 4 x 3,0 mm [Phenomenex, Art.-Nr. ASO-4287]
- Vorsäulenhalter [Phenomenex, Art.-Nr. KJ0-4282]

3.1.8 Materialien und Geräte für genotypische Untersuchungen

3.1.8.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

- Agilent 2100 Bioanalyzer [Agilent, Seriennr. DE04103781]
- Agilent 2100 Expert Software [Agilent, Seriennr. 2012-07-12_09-18-30]
- Agilent DNA 1000 Kit [Agilent Technologies, Art.-Nr. 5067-1504]
- Ballotini Kalknatron-Vollglasperlen SiLiBeads® 1,0-1,2 mm [VWR, Art.-Nr. 201-0491]
- Chloroform z.A. [Merck, Art.-Nr. 102445]
- Einmalimpfösen flexibel 1 µl hellgrün [VWR, Art.-Nr. 612-9356]
- Einmalimpfösen flexibel 10 µl hellblau [VWR, Art.-Nr. 612-9358]
- Eppendorf „Mastercycler gradient“ [Eppendorf]
- Ethanol absolut z.A. [Merck, Art.Nr. 100983]
- Flüssigstickstoff
- HotStarTaq Master Mix Kit (1000 U) [Qiagen, Art.-Nr. 203445]
- LAL-Reagenzwasser steril [Acila® LRW, Art.Nr. 1715006]
- MicroAmp 8-Cap-Strip [Applied Biosystems, Art.Nr. N8010535]
- MicroAmp 8-Tube-Strip 2 ml [Applied Biosystems, Art.Nr. N8010580]
- NanoDrop 2000c Spectrophotometer [Thermo Scientific]
- NucleoSpin® Plant Kit [Macherey & Nagel, Art.Nr. 740770.50]
- Pipette „Eppendorf Reference“ 10-100 µl [Eppendorf, Art.Nr. 4910000.506]
- Pipette „Eppendorf Reference“ 0,5-10 µl [Eppendorf, Art.Nr. 4910000.506]
- Pipette „Eppendorf Reference“ 100-1000 µl [Eppendorf, Art.Nr. 4910000.506]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 10 µl Eppendorf [VWR, Art.Nr. 613-3681]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 200 µl Eppendorf [VWR, Art.Nr. 613-3685]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 50-1000 µl Eppendorf [VWR, Art.Nr. 613-3687]
- Primer [Eurofins Operon]
- Primer ITS-1 [TIB® MOLBIOL]
- Primer ITS-4 [TIB® MOLBIOL]
- Proteinase K recombinant PCR grade [Roche, Art.Nr. 03115828001]
- Reagenzglasschüttler „Vortex Genie 2“ [VWR, Art.Nr. 444-5900]
- Reaktionsgefäße 1,5 ml [Eppendorf]
- Schüttler „IKA-Vibrax-VXR electronic“ TypVX2E [Jahnke & Kunkel, Art.Nr. Nr. 376989]
- Thermomixer Comfort [Eppendorf]
- Zentrifuge „Centrifuge 5417C“ [Eppendorf]

3.1.8.2 Sequenzierung

- Ethanol absolut z.A. [Merck, Art.Nr. 100983]
- LAL-Reagenzwasser steril [Acila® LRW, Art.Nr. 1715006]
- Pipette „Eppendorf Reference“ 0,5-10 µl [Eppendorf, Art.Nr. 4910000.506]
- Pipette „Eppendorf Reference“ 10-100 µl [Eppendorf, Art.Nr. 4910000.506]
- Pipette „Eppendorf Reference“ 100-1000 µl [Eppendorf, Art.Nr. 4910000.506]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 10 µl Eppendorf [VWR, Art.Nr. 613-3681]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 200 µl Eppendorf [VWR, Art.Nr. 613-3685]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 50-1000 µl Eppendorf [VWR, Art.Nr. 613-3687]
- Primer [Eurofins Operon]
- Primer ITS-1 [TIB® MOLBIOL]
- Primer ITS-4 [TIB® MOLBIOL]
- QIAquick® PCR Purification Kit (250) [Qiagen, Art.-Nr. 28106]
- Reaktionsgefäße 1,5 ml [Eppendorf]
- Zentrifuge „Centrifuge 5417C“ [Eppendorf]

3.2 Methoden

3.2.1 Anzucht der Referenzstämme

Alle Referenzstämme wurden auf Malzextraktagar (MEA) als Dreipunktkulturen angezüchtet und für 21 Tage bei 25 °C im mit Wasser befüllten Exsikkator bebrütet. Hierfür wurde mittels Impflanzette Pilzmaterial punktförmig an drei Stellen auf den Agar aufgebracht (SAMSON, 2010). Im weiteren Verlauf wurden die Kulturen wie im Folgenden beschrieben den einzelnen Untersuchungen zugeführt.

3.2.2 Bestimmung der mykogenen Gesamtkeimzahl und phänotypische Charakterisierung der Schimmelpilzisolat

3.2.2.1 Kulturmorphologie

Um die mykogene Gesamtbelastung der Proben zu bestimmen, wurden Verdünnungsreihen angefertigt und auf Malzextraktagar mit Novobiocin-Zusatz (MEA⁺) und Dichloran-Glycerin-Agar (DG-18) ausgebracht. MEA⁺ diente dabei als Basis für die Bestimmung der mykogenen Belastung, DG-18 wurde ausschließlich für die Erfassung xerophiler Schimmelpilze wie z. B. *Eurotium* spp. verwendet. Bei der Auswertung wurden die Ergebnisse beider Nährmedien zusammengefasst. Für diese Analyse wurden 5 g der Kräuterprobe mit 45 ml einprozentigem Peptonwasser für 2 min im Stomacher vermengt und aus der Flüssigkeit eine dezimale Verdünnungsreihe bis zur Stufe 10⁻³ hergestellt. Von jeder Verdünnung wurde 1 ml auf eine Nährbodenplatte pipettiert und mittels DRIGALSKI-Spatel gleichmäßig verteilt (SAMSON, 2010).

Anschließend wurden die Platten im Brutraum bei 25 °C bebrütet. Ab dem vierten Tag erfolgte eine tägliche stereomikroskopische Untersuchung der Platten. Die taxonomische Zuordnung der Schimmelpilze auf Gattungsebene wurde anhand kulturmorphologischer Kriterien wie Größe, Farbe, Form und Oberflächentextur der Kolonien makroskopisch und stereomikroskopisch bei 40-facher Vergrößerung durchgeführt. Um langsam wachsende, zelluloseverwertende Schimmelpilze vor Überwucherung zu schützen, wurden die Proben zusätzlich auf Filterpapier untersucht. Hierfür wurden Papier-Rundfilter in Petrischalen gelegt und mit 0,4 ml der flüssigen, nährstoffarmen Minimalmedien nach VAN ITERSON (FORGACS und CARLL, 1962; HINTIKKA, 1977a) und nach OHFF und WEISSBACH (1984)

getränkt. Anschließend wurden 15-20 einzelne, in einprozentigem Peptonwasser getränkte Gewürzblättchen mittels Pinzette auf dem Filter ausgebracht, die Platten in einen mit Wasser befüllten Exsikkator gestellt und für vier Wochen im Brutraum bei 25 °C bebrütet. Die Schimmelpilzgattungen wurden wöchentlich anhand der kulturmorphologischen Eigenschaften bei 40-facher Vergrößerung unter dem Stereomikroskop bestimmt.

3.2.2.2 Mikromorphologie

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurde Pilzmaterial mit kristallklarem Klebeband von den Kolonien abgenommen, auf einem Objektträger mit Anilinblau angefärbt und bei 400-facher Vergrößerung betrachtet. Die taxonomische Zuordnung erfolgte anhand der Form, Größe und Farbe der Konidiophoren, Phialiden und Konidien (SAMSON, 2010).

3.2.3 *Stachybotrys*-Isolate

Identifizierte *Stachybotrys*-Isolate wurden mit einer Impföse vom Nährboden bzw. mit einer Impflanzette unter dem Stereomikroskop vom Filter abgenommen und als Verdünnungsausstriche auf MEA⁺ aufgebracht. Diese Ausstriche wurden bei 25 °C im Brutraum für ca. eine Woche bebrütet. Aus den Verdünnungsausstrichen wurden schließlich Reinkulturen in Form von Dreipunktkulturen auf MEA angezüchtet (SAMSON, 2010). Auf die Zugabe eines Antibiotikums zum Nährmedium konnte im weiteren Verlauf verzichtet werden, da es sich bei den Isolaten um Reinkulturen handelte.

Die Unterscheidung von Isolaten erfolgte nach makroskopischen Unterschieden im Koloniebild. Auf unterschiedlichen Nährmedien gewachsene *Stachybotrys* spp. aus derselben Probe wurden als unterschiedliche Isolate gewertet.

Zur Konservierung der Isolate wurden MEA-Schrägagarröhrchen mit den jeweiligen Reinkulturen beimpft und für drei Wochen bei 25 °C bebrütet. Danach erfolgte eine Abschwemmung der Sporen aus den Schrägagarröhrchen mit einprozentigem Peptonwasser. Von diesen Sporensuspensionen wurde je 1 ml in Rollrandfläschchen mit lyophilisierter zehnprozentiger Magermilchlösung pipettiert und gefriergetrocknet.

Von den Referenzstämmen aus Dänemark wurden zudem elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Hierfür wurden Dreipunktkulturen auf MEA

angeimpft und für drei Wochen bei 25 °C bebrütet. Anschließend wurden etwa 5 x 5 mm große Stücke aus dem Agar samt Schimmelkolonie ausgeschnitten und in sechsprozentigem Glutardialdehyd für 16 Stunden fixiert. Nach einem Waschschrift mit destilliertem Wasser erfolgte die Entwässerung und Verfestigung der Proben mittels Ethylenglycolmonoethylether und Aceton sowie die Kritisch-Punkt-Trocknung. Die so zur längeren Aufbewahrung gewonnenen Probenblöcke wurden auf Probenhalter geklebt, durch Kathodenbestäubung (Sputtern) mit Gold überschichtet, um die Oberfläche leitfähig zu machen, und im Rasterelektronenmikroskop betrachtet.

3.2.4 Extraktion der *Stachybotrys*-Isolate

Die Toxinextraktion der *Stachybotrys*-Isolate wurde mit Chloroform durchgeführt (ROTHENEDER, 1996). Hierfür wurden von jedem Isolat drei Dreipunktkulturen auf MEA angelegt und für 21 Tage bei 25 °C im wasserbefüllten Exsikkator bebrütet. Alle drei bewachsenen Agarplatten wurden in einen Stomacherbeutel eingewogen, in 75 ml Chloroform aufgenommen und für fünf Minuten im Stomacher vermengt. Anschließend wurde die Flüssigkeit über einen Faltenfilter mit wasserfreiem Natriumsulfat in einen Rundkolben überführt und die gesamte Prozedur mit dem im Beutel verbliebenen Probenmaterial wiederholt. Der Inhalt des Rundkolbens wurde bei 40 °C im Rotationsverdampfer eingedampft, in 6 ml Chloroform wiederaufgenommen und über einen Spritzenfilter in ein 10 ml Schraubverschlussröhrchen überführt. Nachdem der Inhalt der Röhrchen im Wasserbad bei 40 °C unter Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft wurde, wurde er erneut in Chloroform aufgenommen, zu Portionen aliquotiert, die 15 g Agarplatte entsprachen und wiederum unter Stickstoffstrom eingedampft. Diese Proben wurden bis zur jeweiligen Analyse mittels MTT-Test, ELISA und LC-MS/MS im Gefrierschrank bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.5 MTT-Zellkulturtest

Die Extrakte der *Stachybotrys*-Isolate wurden zur Bestimmung der Zytotoxizität mittels MTT-Zellkulturtest untersucht (GAREIS, 2006). Hierfür wurden in Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) kultivierte swine kidney-Zellen (SK-Zellen) mittels Trypsin-EDTA aus den Zellkulturflaschen gelöst, in Spezial-MEM (MEM +1,7 % Ethanol + 0,3 % Dimethylsulfoxid (DMSO) + doppelt konzentriertes fötales Kälberserum (FKS)) aufgenommen und je 100 µl in die Kavitäten einer 96-Loch-Mikrotiterplatte vorgelegt. Anschließend wurden aus den in Kapitel 3.2.4 beschriebenen Extrakten 30 Verdünnungsstufen (je 1:2) in einer separaten 96-Loch-Mikrotiterplatte hergestellt und je 100 µl jeder Verdünnung auf die entsprechenden Kavitäten mit den Zellkulturen pipettiert. Nach kurzem Schütteln wurden die Platten für 48 Stunden im CO₂-Brutschrank bei 37 °C inkubiert (REUBEL et al., 1987; REUBEL et al., 1989; HANELT et al., 1994). Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 µl MTT, eine kurze Durchmischung und erneute Bebrütung im CO₂-Schränk bei 37 °C für 4 Stunden. Daraufhin wurde die Flüssigkeit aus den Kavitäten abgezogen, je 100 µl DMSO als Lösungsvermittler zugegeben und die Platten für fünf Minuten geschüttelt.

Die Auswertung der Platten erfolgte mittels eines ELISA-Readers, mit dem die optische Dichte der nach Spaltung des MTT gebildeten Formazane bei 510 nm gemessen wurde. Als Standardtoxin und Positivkontrolle wurde Roridin A mitgeführt.

Extrakte mit IC₅₀-Werten $\geq 7,50$ g/ml wurden als nicht toxisch, Extrakte mit Werten von $< 7,50$ g/ml–0,47 g/ml als gering toxisch und Extrakte mit IC₅₀-Werten $< 0,47$ g/ml als hochtoxisch eingestuft. Diese Einteilung wurde auf Basis früherer Erfahrungen bei ähnlichen Fragestellungen vorgenommen (GAREIS, 2011).

3.2.6 ELISA

Die Bildung von makrozyklischen Trichothecenen durch die *Stachybotrys*-Isolate wurde mittels ELISA überprüft. Hierfür wurde das Envirologix Quantitox™ Kit for Trichothecenes (Envirologix, Maine, USA) verwendet. Dieser Test weist laut Herstellerangaben folgende Trichothecene nach: Roridin A, E, H und L-2, Satratoxin G und H, Isosatratoxin F, Verrucarol, sowie Verrucaridin A und J. Eine Unterscheidung der Toxine ist mit diesem Testkit nicht möglich. Die quantitativen

Angaben der Ergebnisse erfolgen als Roridin A-Äquivalent.

Die Durchführung des Tests erfolgte nach Herstellerangaben. Aus einer im Test mitgelieferten Roridin A-Standardlösung wurde eine Standardreihe von 0,2-18 ng/ml hergestellt. Zunächst wurden die *Stachybotrys*-Extrakte (vgl. Kapitel 3.2.4) in 7,5 ml PBS resuspendiert. In Abhängigkeit von der zuvor im Zellkulturtest festgestellten Zytotoxizität wurden Verdünnungsstufen zwischen 1:2 und 1:5000 hergestellt. Isolate, die im Zellkulturtest nicht oder gering toxisch waren, wurden jeweils 1:2 und 1:50 verdünnt, Isolate, die im Zellkulturtest eine höhere Toxizität zeigten, wurden jeweils 1:500 und 1:5000 verdünnt. Jede dieser Verdünnungen wurde im Doppelansatz gemessen. Lagen die Ergebnisse dieser Verdünnungsstufen außerhalb der Kalibrationsgeraden wurden zusätzlich die Verdünnungsstufen 1:1000, 1:2000 und 1:3500 getestet.

Zur Durchführung des Tests wurden 50 µl der Extrakte bzw. der Standards in die Kavitäten der ELISA-Platte vorgelegt. Anschließend wurden zügig 50 µl Enzym-Konjugat zugegeben und die Platte für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem anschließenden Waschschrift wurden 100 µl Substrat zugegeben und die Platte erneut für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde das im Test enthaltene Stop-Reagens zugegeben. Die Messung der Extinktionen erfolgte photometrisch bei 450 nm in einem ELISA-Reader.

3.2.7 LC-MS/MS

Das Toxinprofil der *Stachybotrys*-Isolate wurde mittels LC-MS/MS bestimmt. Dabei wurden folgende Toxine erfasst: Satratoxin G, H und F, Roridin E und L-2 sowie Verrucarin J. Eine Quantifizierung fand nur für die Mykotoxine Satratoxin G und Satratoxin H statt, die übrigen Toxine wurden nur qualitativ erfasst, da kommerzielle Standards nicht erhältlich sind. Die kommerziell verfügbaren *Myrothecium verrucaria*-Metabolite Roridin A und Verrucarin A wurden als Kontrollstandards mitgeführt. Die unter Kapitel 3.2.4 beschriebenen Extrakte wurden für die LC-MS/MS-Messung in 1,0 ml mobiler Phase (10 % Methanol, 90 % Wasser) gelöst. Tabelle 18 gibt die Bedingungen für die Flüssigkeitschromatographie wieder.

Tabelle 18: Bedingungen für die Flüssigkeitschromatographie

Säule:	YMC Tri Art C18, 150 x 3 mm, 3 µm		
Injektionsvolumen:	20 µl		
Mobile Phase:	Methanol + 5 mM Ammoniumformiat (Eluent A) Reinstwasser + 5 mM Ammoniumformiat (Eluent B)		
Gradientenprogramm (linear):	Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
	0	10	90
	6	10	90
	26	100	0
	30	100	0
Flussrate:	400 µl/min		

Die MS-spezifischen Parameter (API 3200, ABSciex) und Quellenparameter sind in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Quellenparameter für die Tandem-Massenspektrometrie

Scan Type:	Multiple reaction monitoring (MRM)
Ionisierung:	Elektrospray positiv (ESI +)
Curtaingas (CUR):	10 psi
Ionisierungsspannung (ISV):	4000 V
Temperatur (TEM):	300 °C
Nebulizergas (GS1):	50 psi
Heizgas (GS2):	30 psi
Kollisionsgas (CAD):	Stufe 7

In Tabelle 20 sind die substanzspezifischen MS-Parameter für die Messung der einzelnen Mykotoxine aufgeführt. Die Parameter für die nicht als Standardsubstanzen erhältlichen Toxine wurden mithilfe von Extrakten aus Kulturen des Referenzstamms S1114 gewählt und optimiert (GOTTSCALK, 2013).

Tabelle 20: Substanzspezifische LC-MS/MS-Parameter der untersuchten Toxine (nach GOTTSCHALK et al., 2006; GOTTSCHALK, 2013)

Analyt	Precursor Ion [M+NH ₄] ⁺	Produkt- ionen	DP [V]	EP [V]	CEP [V]	CE [eV]	CXP [V]
Satratoxin G	562,3	248,9	21	3,5	22	19	22
		231,0	21	3,5	22	21	22
Satratoxin H	546,3	245,2	21	4,5	20	25	22
		231,0	21	4,5	20	25	18
Satratoxin F	560,4	249,1	41	4,0	26	21	12
		231,1	41	4,0	26	21	12
Roridin A (Kontrollstandard)	550,4	249,1	26	3,5	24	23	20
		133,0	26	3,5	24	41	10
Roridin E	532,4	361,1	31	4,5	20	19	30
		231,1	31	4,5	20	25	20
Roridin L-2	548,3	249,1	31	4,0	24	21	22
		231,0	31	4,0	24	21	18
Verrucarín A (Kontrollstandard)	520,4	248,8	31	5,0	24	23	22
		230,9	31	5,0	24	27	20
Verrucarín J	502,4	249,0	30	5,0	25	25	22
		231,0	30	5,0	25	25	22

DP = Declustering potential; EP = Entrance potential; CEP = Cell entrance potential; CE = Collision energy; CXP = Cell exit potential

3.2.8 PCR

Um eine genotypische Zuordnung der Isolate zu erhalten, wurden die Genabschnitte ITS, Tri5, Tub2 und Chs1 mittels PCR amplifiziert. Hierfür wurden für jede Kräuterart *Stachybotrys*-Isolate mit geringer und höherer Toxizität bzw. Toxinbildung ausgewählt.

Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem NucleoSpin® Plant Kit nach Herstellerangaben. Bei der Probenvorbereitung wurden Modifikationen vorgenommen, um einen besseren Aufschluss der Zellen zu gewährleisten. Zunächst wurde Pilzmaterial von drei Wochen alten *Stachybotrys*-Kolonien nach Herstellerangaben in Ethanol überführt und gemischt. Nach Abzentrifugieren des Alkohols wurden Glasperlen sowie der Lysepuffer zugegeben, die Probengefäße in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend für drei Minuten geschüttelt (Abbildung 14).

Probenvorbereitung und Zell-Lyse:

- 50-200 mg Mycel in 1,5 ml Tube mit 1000 µl Ethanol überführen
- Schütteln
- 2 x 5 min zentrifugieren (11000 x g), jeweils Ethanol abpipettieren
- 150 mg sterile Glaskügelchen und 200 µl Lysepuffer PL1 zugeben
- Tubes 2 x in flüssigem Stickstoff gefrieren und jeweils 3 min schütteln
- 200 µl Lysepuffer PL1 zugeben
- Tubes 2 x in flüssigem Stickstoff gefrieren und jeweils 3 min schütteln
- 10 µl RNase-Lösung + 10 µl Proteinase K zugeben
- 5 min schütteln
- 60 min bei 65 °C inkubieren (Thermomixer, 300 rpm)
- 100 µl Chloroform zugeben, 10 sek schütteln
- 15 min zentrifugieren (14500 x g)

**Filtration und Binden:**

- Obere Phase in Sammel tube mit violettem Filter pipettieren
- 2 min zentrifugieren (11000 x g), Filter werfen
- 450 µl Puffer PC zugeben
- Schütteln und max. 700 µl des Gemisches in Sammel tube mit grüner Säule geben
- 1 min zentrifugieren (11000 x g), Durchfluss werfen

**Waschen und Trocknen:**

- 400 µl Waschpuffer PW1 zugeben
- 1 min zentrifugieren (11000 x g), Durchfluss werfen
- 700 µl Waschpuffer PW2 zugeben
- 1 min zentrifugieren (11000 x g), Durchfluss werfen
- 200 µl Waschpuffer PW2 zugeben
- 1 min zentrifugieren (11000 x g), Durchfluss werfen
- 2 min zentrifugieren (11000 x g), Sammel tube werfen

**Elution:**

- Säule in neues 1,5 ml Tube stellen
- 50 µl Puffer PE zugeben
- 5 min bei 70 °C inkubieren (Thermomixer, 300 rpm)
- 1 min zentrifugieren (11000 x g)
- 50 µl Puffer PE zugeben
- 5 min bei 70 °C inkubieren (Thermomixer, 300 rpm)
- 1 min zentrifugieren (11000 x g)
- Säule werfen, DNA in Tube aufbewahren

Abbildung 14: Isolierung genomischer DNA von *Stachybotrys* spp. mit dem NucleoSpin® Plant II-Kit von MACHEREY-NAGEL (modifiziert)

Der Vorgang des Gefrierens und Schüttelns wurde insgesamt viermal durchgeführt, um die DNA aus den Pilzzellen ausreichend aufschließen zu können. Anschließend wurde die DNA nach Herstellerangaben aufgereinigt und die Konzentration der so erhaltenen DNA photometrisch mittels NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Waltham, USA) gemessen.

3.2.8.1 ITS-Sequenz

Zur Amplifizierung des ITS-Genabschnittes wurden die Primer

- ITS 1 (Sequenz: 5`TCCGTAGGTGAACCTGCGG`3)

- ITS 4 (Sequenz: 5`TCCTCCGCTTATTGATATGC`3)

gewählt (WHITE et al., 1990). Dieses PCR-System dient gleichzeitig als externe Amplifikationskontrolle bei Schimmelpilzen, da alle Schimmelpilze dieses Gen besitzen (vgl. Abbildung 3, Kapitel 2.1.3). Ein negatives PCR-Ergebnis weist daher auf eine Inhibition hin.

Tabelle 21 zeigt den Reaktionsansatz, mit dem die PCR in Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

Tabelle 21: Reaktionsansatz (25 µl) für die ITS-PCR (HUBER, 2012)

	Konzentration Stammlösung	Endkonzentration	µl/Ansatz
LAL-Reagenzwasser			6,5
Qiagen HotStar Taq Mastermix	2 x	1 x	12,5
Primer ITS1	10 µM	0,2 µM	0,5
Primer ITS4	10 µM	0,2 µM	0,5
DNA	ca. 50 ng/µl		5,0

Anschließend erfolgte die Amplifikation unter den in Tabelle 22 dargestellten Bedingungen in einem „Mastercycler gradient“ (Eppendorf, Hamburg). Die PCR-Produkte wurden nach Herstellerangaben mittels On-Chip-Gelelektrophorese auf dem Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) sichtbar gemacht, wobei gleichzeitig die Konzentration gemessen wurde. Hierfür wurde die DNA aus den beiden 25 µl-Ansätzen gepoolt und anschließend 1 µl auf den Chip aufgetragen.

Tabelle 22: Temperaturprogramm für die ITS-PCR (HUBER, 2012)

Schritt	T [°C]	Zeit	Wiederholungen
1	95	10 min	1 x
2	95	20 sek	45 x
	52	30 sek	
	72	90 sek	
3	72	10 min	1 x
4	10	unendlich	

3.2.8.2 Tri5-Sequenz

Der Sequenzabschnitt des Tri5-Gens, der durch die Primer

- 5`CATCAATCCAACAGTTTCAC`3 (forward)

- 3`GCAACCTTCAAAGACTATTG`5 (reverse)

amplifiziert wird (CRUSE et al., 2002), unterscheidet sich jeweils für *S. chartarum* Chemotyp A, Chemotyp S und *S. chlorohalonata* (vgl. Kapitel 2.1.3).

Der Reaktionsansatz für die Tri5-PCR ist in Tabelle 23 zu sehen.

Tabelle 23: Reaktionsansatz (25 µl) für die Tri5-PCR

	Konzentration Stammlösung	Endkonzentration	µl/Ansatz
LAL-Reagenzwasser			5,5
Qiagen Hotstar Taq Mastermix	2 x	1 x	12,5
Primer forward	10 µM	0,4 µM	1,0
Primer reverse	10 µM	0,4 µM	1,0
DNA	ca. 50 ng/µl		5,0

Für die Amplifikation im „Mastercycler gradient“ wurden folgende Bedingungen gewählt (Tabelle 24):

Tabelle 24: Temperaturprogramm für die Tri5-PCR

Schritt	T [°C]	Zeit	Wiederholungen
1	95	10 min	1 x
2	95	20 sek	45 x
	51	30 sek	
	72	45 sek	
3	72	10 min	1 x
4	10	unendlich	

Der Nachweis der PCR-Produkte sowie die Messung der Konzentration wurden wie in Kapitel 3.2.8.1 beschrieben mittels Bioanalyzer durchgeführt.

3.2.8.3 Tub2-Sequenz

Der Sequenzabschnitt Tub2 (vgl. Kapitel 2.1.3) wurde mit den Primern

- 5`CTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAAC`3 (forward)
- 3`ACCCTCACCAAGTATACCAATGCAAGAAAGC`5 (reverse)

amplifiziert (CRUSE et al., 2002). Reaktionsansatz und Cyclerbedingungen wurden wie in Kapitel 3.2.8.2 gewählt und die Produkte anschließend mit dem Bioanalyzer vermessen.

3.2.8.4 Chs1-Sequenz

Für die Amplifikation der Chs1-Sequenz (vgl. Kapitel 2.1.3) wurden die Primer

- 5`ATCTCACCACAAGCACCGCCACACA`3 (forward)
- 3`GGAAGAAGATCG-TTGTGTGCGTGGT`5 (reverse)

(CRUSE et al., 2002) verwendet. Auch für diese PCR wurden Reaktionsansatz und Cyclerbedingungen wie in Kapitel 3.2.8.2 gewählt und die Auswertung mittels Bioanalyzer durchgeführt.

3.2.9 Sequenzierung

Für die genaue Speziesdifferenzierung wurden die aufgereinigten PCR-Produkte definierter Isolate zur Sequenzierung an die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) geschickt. Hierfür wurde die amplifizierte DNA mit dem QIAquick® PCR Purification Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt (Abbildung 15) und anschließend auf eine Konzentration von 5 ng/µl eingestellt. Die für die Sequenzierung nötigen Primer wurden den Anweisungen der Firma folgend auf 2 µM verdünnt und jeweils 15 µl pro Reaktionsansatz mitgeschickt.

Binden:

- 250 µl Puffer PB zum PCR-Produkt geben
- Schütteln
- Bei Farbumschlag auf orange oder violett 10 µl 3M Na-Acetat zugeben
- Gemisch auf Sammeltube mit Säule pipettieren
- 1 min zentrifugieren (14000 x *g*)

**Waschen und Trocknen:**

- Säule in neues Sammeltube stellen
- 750 µl Puffer PE zugeben
- 1 min zentrifugieren (14000 x *g*)
- Säule in neues Sammeltube stellen
- 1 min zentrifugieren (14000 x *g*)

**Elution:**

- Säule in neues 1,5 ml Tube stellen
- 50 µl Puffer EB zugeben
- 1 min einwirken lassen
- 1 min zentrifugieren (14000 x *g*)
- Säule verwerfen, Eluat aufbewahren

Abbildung 15: Aufreinigung der PCR-Produkte für die Sequenzierung mittels QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen)

Die Sequenzierung erfolgte mittels Cycle-Sequencing-Methode. Diese ist eine Weiterentwicklung der klassischen SANGER-Methode (SANGER et al., 1977). Hierbei werden DNA, Primer, hitzestabile DNA-Polymerase, dNTP's (Desoxyribonukleosidtriphosphate) und fluoreszenzmarkierte ddNTP's (Didesoxyribonukleosidtriphosphate) mit Puffer zu einem Reaktionsansatz pipettiert. Die Primer binden an komplementäre DNA-Stränge und werden solange verlängert, bis zufällig und in Abhängigkeit der komplementären Base ein fluoreszenzmarkiertes ddNTP bindet. Dieses verhindert durch die Didesoxyform eine weitere Strangverlängerung. Auf diese Art und Weise entstehen Sequenzstücke aller möglichen

Längen, die nach Aufreinigung kapillarelektrophoretisch aufgetrennt werden. Mittels Laserstrahl werden die Farbstoffmoleküle am Ende der Sequenzstücke angeregt und ein Fluoreszenzsignal gemessen. Die Auswertung dieser Signale mittels Sequenzanalysesoftware ergibt schließlich die Sequenz des untersuchten Abschnitts (ANONYMOUS, 2013c).

Die so erhaltenen Sequenzen der einzelnen Isolate für die vier Genabschnitte wurden anschließend mit den entsprechenden Vergleichssequenzen der NCBI-Datenbank verglichen (ANONYMOUS, 2012). Ebenso wurden die Sequenzen der untersuchten Referenzstämme in die Vergleiche miteinbezogen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Mykogene Mikrobiota

Insgesamt wurden aus den 80 untersuchten Kräuterproben neben Hefen und Streptomyceten Schimmelpilze 53 verschiedener Gattungen isoliert (Abbildung 16). Hefen und *Streptomyces* spp. wurden in der Gesamtkeimzahl berücksichtigt, jedoch nicht näher taxonomisch bestimmt. In den Tabellen 25-28 sind die dominanten Schimmelpilzgattungen der einzelnen Kräuterarten getrennt nach Nährmedien aufgelistet. Dominante Gattungen, die bei allen Kräuterarten in ≥ 50 % der Proben vorkamen, waren *Aspergillus*, *Eurotium* und *Rhizopus*. Weitere dominante Gattungen in Majoran waren *Alternaria*, *Chaetomium* und *Cladosporium* (Tabelle 25). *Penicillium* spp. wurden zusätzlich aus mehr als 50 % der Oregano- und Thymianproben isoliert (Tabellen 26 und 27), *Phoma* spp. gehörten zu den dominanten Schimmelpilzen in Bohnenkraut (Tabelle 28). Weiter ist zu erkennen, dass die höchsten Isolierungsraten mittels nährstoffreicher Nährmedien (MEA+, DG-18) erreicht wurden. Die Ergebnisse für diese beiden Nährmedien wurden zusammengefasst (vgl. Kapitel 3.2.2.1). Die Filterpapiermethode förderte neben dem Wachstum von zellulolytischen Pilzen auch die Isolierung von Streptomyceten.

Stachybotrys spp. (vgl. Kapitel 4.2) wurden aus jeweils 15 % der Bohnenkrautproben und je 20 % der Majoran-, Oregano- und Thymianproben isoliert (Abbildung 16).

Abbildung 16 sowie Tabelle 40 im Anhang zeigen alle aus den Kräutern isolierten Schimmelpilzgattungen. Die auf den verschiedenen Nährböden (MEA⁺, DG-18, IT und OF) gewachsenen Schimmelpilzgattungen sind im Einzelnen den Tabellen 41-43 im Anhang zu entnehmen. Tabelle 44 im Anhang zeigt die aus konventionell erzeugten Kräuterproben isolierten Schimmelpilzgattungen im Vergleich zu ökologisch erzeugten Proben.

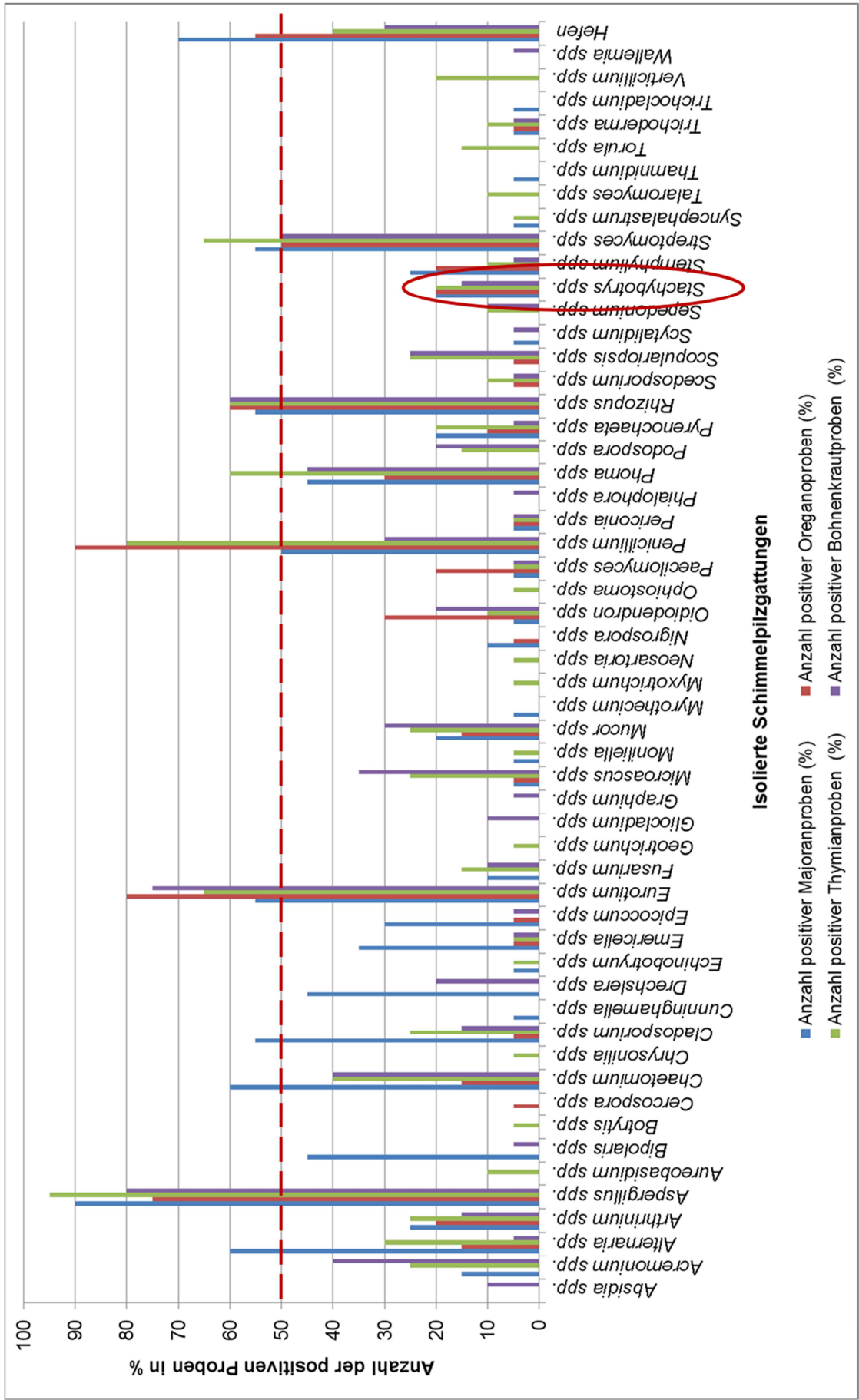


Abbildung 16: Aus den Kräuterproben (Majoran, Oregano, Thymian, Bohnenkraut, je n = 20) isolierte mykogene Mikrobiota

Tabelle 25: Isolierungsraten (%) der in Majoran dominant vorkommenden Schimmelpilzgattungen auf verschiedenen Nährmedien

Schimmelpilzgattung	Isolierungsrate (%)		
	MEA ⁺ +DG-18	IT	OF
<i>Alternaria</i> spp.	20	35	35
<i>Aspergillus</i> spp.	75	75	75
<i>Chaetomium</i> spp.	5	45	40
<i>Cladosporium</i> spp.	45	15	10
<i>Eurotium</i> spp.	50	30	25
<i>Penicillium</i> spp.	45	35	25
<i>Rhizopus</i> spp.	60	20	30

MEA: Malzextraktagar, DG-18: Dichloran-Glycerin-Agar, IT: Nährmedium nach VAN ITERSON, OF: Nährmedium nach OHFF und WEISSBACH

Tabelle 26: Isolierungsraten (%) der in Oregano dominant vorkommenden Schimmelpilzgattungen auf verschiedenen Nährmedien

Schimmelpilzgattung	Isolierungsrate (%)		
	MEA ⁺ +DG-18	IT	OF
<i>Aspergillus</i> spp.	75	70	70
<i>Eurotium</i> spp.	80	15	10
<i>Penicillium</i> spp.	70	35	60
<i>Rhizopus</i> spp.	70	5	15

MEA: Malzextraktagar, DG-18: Dichloran-Glycerin-Agar, IT: Nährmedium nach VAN ITERSON, OF: Nährmedium nach OHFF und WEISSBACH

Tabelle 27: Isolierungsraten (%) der in Thymian dominant vorkommenden Schimmelpilzgattungen auf verschiedenen Nährmedien

Schimmelpilzgattung	Isolierungsrate (%)		
	MEA ⁺ +DG-18	IT	OF
<i>Aspergillus</i> spp.	85	45	55
<i>Eurotium</i> spp.	65	0	5
<i>Penicillium</i> spp.	70	30	55
<i>Phoma</i> spp.	45	35	40
<i>Rhizopus</i> spp.	50	10	10

MEA: Malzextraktagar, DG-18: Dichloran-Glycerin-Agar, IT: Nährmedium nach VAN ITERSON, OF: Nährmedium nach OHFF und WEISSBACH

Tabelle 28: Isolierungsraten (%) der in Bohnenkraut dominant vorkommenden Schimmelpilzgattungen auf verschiedenen Nährmedien

Schimmelpilzgattung	Isolierungsrate (%)		
	MEA ⁺ +DG-18	IT	OF
<i>Aspergillus</i> spp.	70	45	35
<i>Eurotium</i> spp.	80	10	5
<i>Rhizopus</i> spp.	50	10	10

MEA: Malzextraktagar, DG-18: Dichloran-Glycerin-Agar, IT: Nährmedium nach VAN ITERSON, OF: Nährmedium nach OHFF und WEISSBACH

Die Ergebnisse der mykogenen Belastungen der vier verschiedenen Kräuterarten sind in Abbildung 17 dargestellt. Wie ersichtlich lag die mykogene Gesamtkeimzahl (GKZ) bei dem überwiegenden Anteil der Proben (71 %) im Bereich von 10 bis 10^5 KbE/g. Fünf Proben wiesen eine GKZ über dem Richtwert der DGHM von 10^5 KbE/g auf (ANONYMOUS, 2011a). Hierbei handelte es sich um eine ökologisch erzeugte Majoranprobe, eine konventionell erzeugte Oreganoprobe, zwei ökologisch erzeugte Thymianproben und eine ökologisch erzeugte Bohnenkrautprobe. Insgesamt 18 Proben (22 %) wiesen eine GKZ von 10 KbE/g oder kleiner auf.

Der Großteil der Proben mit einer mykogenen GKZ von 10 - 10^5 KbE/g war konventionell erzeugt. Im Bereich unter 10 KbE/g waren Proben aus ökologischer Erzeugung stärker vertreten als konventionell erzeugte Proben. Dem gegenüber stammten von fünf hochbelasteten Proben (GKZ $>10^5$ KbE/g) vier aus ökologischer Erzeugung und nur eine aus konventioneller Erzeugung (Abbildung 17, Tabelle 45 im Anhang). Im Hinblick auf die Erzeugungsweise konnte kein Unterschied bezüglich der mykogenen Mikrobiota festgestellt werden. Eine statistische Auswertung wurde aufgrund der zu geringen Probenzahl nicht durchgeführt.

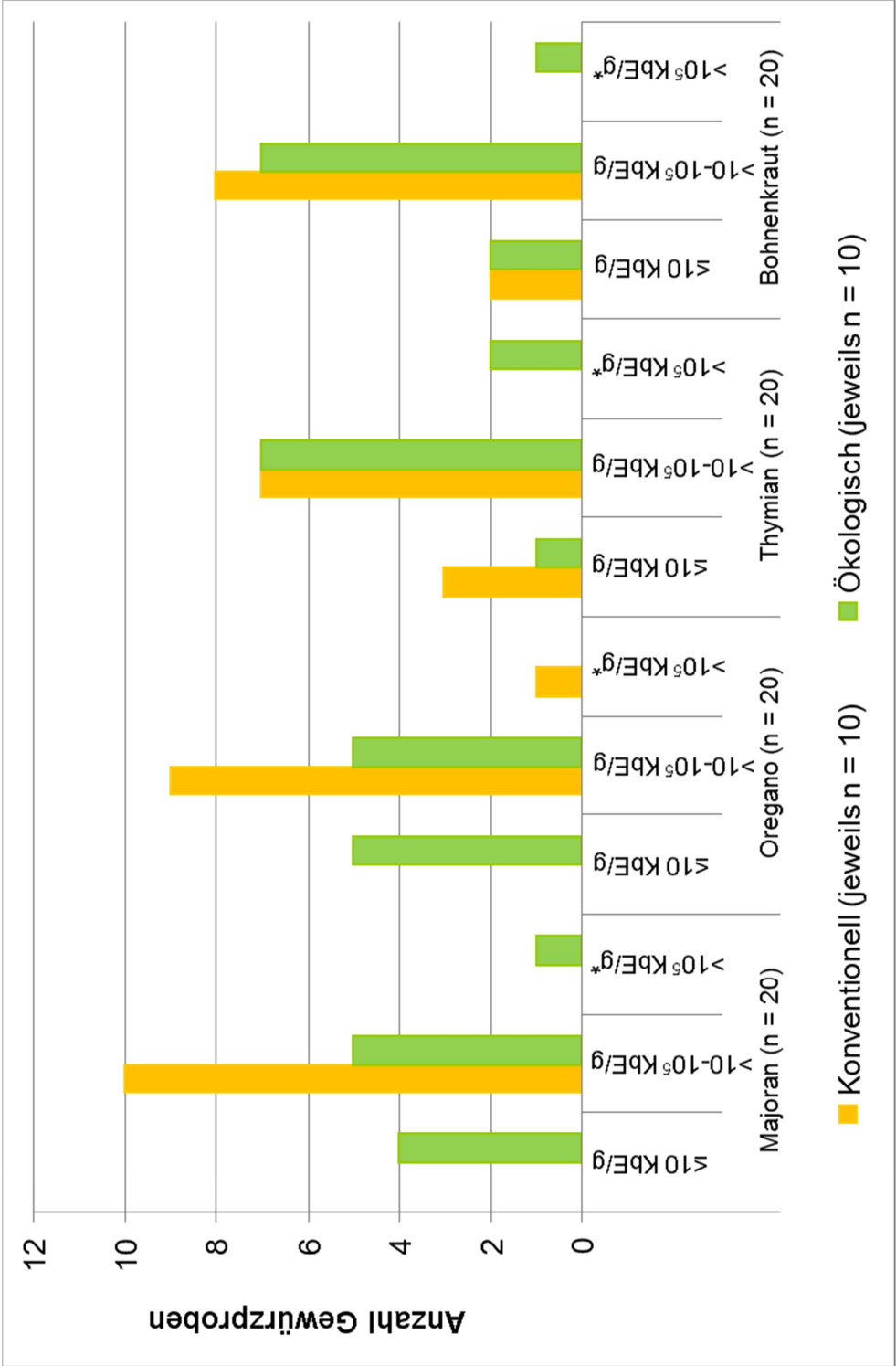


Abbildung 17: Mykogene Gesamtkeimzahlen der Kräuterproben (Majoran, Oregano, Thymian und Bohnenkraut, jeweils n = 20) unter Berücksichtigung der Erzeugungsweise (* über DGHM-Richtwert)

4.2 Isolierung von *Stachybotrys* spp.

Insgesamt wurden 50 *Stachybotrys* spp. aus den Kräutern isoliert. 24 davon stammten aus der orientierenden Studie mit Majoran (vgl. Kapitel 3.1.1). Tabelle 29 zeigt die Herkunft dieser 24 Isolate und die Nährmedien, auf denen sie isoliert wurden. Wie ersichtlich wurden bis auf ein Isolat, das auf MEA⁺ gefunden wurde, alle *Stachybotrys* spp. mit der Filterpapiermethode isoliert.

Tabelle 29: Zuordnung der *Stachybotrys*-Isolate aus der orientierenden Studie (vgl. Kapitel 3.1.1) zu den untersuchten Kräuterarten

Kräuterart	Erzeugungsweise	Probe	Nährmedium	Isolat
Majoran	konventionell	BM3	IT	SBM1
Majoran	konventionell	BM3	IT	SBM2
Majoran	konventionell	BM3	IT	SBM3
Majoran	konventionell	BM3	IT	SBM4
Majoran	konventionell	BM3	OF	SBM5
Majoran	konventionell	BM3	OF	SBM6
Majoran	konventionell	BM10	MEA ⁺	SBM7
Majoran	konventionell	BM10	IT	SBM8
Majoran	konventionell	BM11	IT	SBM9a
Majoran	konventionell	BM11	IT	SBM9b
Majoran	konventionell	BM11	IT	SBM10
Majoran	konventionell	BM11	IT	SBM11
Majoran	konventionell	BM11	OF	SBM12a
Majoran	konventionell	BM11	OF	SBM12b
Majoran	konventionell	BM11	OF	SBM13
Majoran	konventionell	BM17	IT	SBM14a
Majoran	konventionell	BM17	IT	SBM14b
Majoran	konventionell	BM17	OF	SBM15
Majoran	konventionell	BM17	OF	SBM16
Majoran	konventionell	BM17	OF	SBM17a
Majoran	konventionell	BM17	OF	SBM17b
Majoran	konventionell	BM17	OF	SBM17c
Majoran	konventionell	BM18	OF	SBM18
Majoran	konventionell	BM18	OF	SBM19

MEA⁺: Malzextraktagar mit Antibiotikum, IT: Nährmedium nach VAN ITERSON, OF: Nährmedium nach OHFF und WEISSBACH

26 weitere *Stachybotrys*-Isolate stammten aus der nachfolgenden Untersuchung von 80 Kräuterproben (Majoran, Oregano, Thymian, Bohnenkraut, je n = 20).

Hierbei waren 15 Proben positiv. Bei diesen handelte es sich um vier Majoranproben (drei konventionell erzeugte Proben mit vier Isolaten und eine ökologisch erzeugte Probe mit sieben Isolaten), vier konventionell erzeugte Oreganoproben (fünf Isolate), vier ökologisch erzeugte Thymianproben (fünf Isolate) und drei ökologisch erzeugte Bohnenkrautproben (fünf Isolate) (Abbildung 18). Zwölf Isolate wurden auf IT gefunden, neun auf OF und fünf der insgesamt 26 Isolate auf MEA⁺. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 30 dargestellt. Die Herkunft der einzelnen Kräuterproben ist den Tabellen 38 und 39 im Anhang zu entnehmen.

Tabelle 30: Zuordnung der *Stachybotrys*-Isolate zu den untersuchten Kräuterarten

Gewürzart	Erzeugungsweise	Probe	Nährmedium	Isolat
Majoran	Konventionell	BM40	IT	SBM20
Majoran	Konventionell	BM32	IT	SBM21
Majoran	Konventionell	BM32	OF	SBM22
Majoran	Konventionell	BM32	OF	SBM23
Majoran	Konventionell	BM28	IT	SBM24
Majoran	Konventionell	BM28	OF	SBM25
Majoran	Konventionell	BM28	OF	SBM26
Majoran	Ökologisch	BM26	MEA ⁺	SBM27
Majoran	Ökologisch	BM26	MEA ⁺	SBM28
Majoran	Ökologisch	BM26	IT	SBM29
Majoran	Ökologisch	BM26	OF	SBM30
Oregano	Konventionell	BO10	IT	SBO1a
Oregano	Konventionell	BO10	OF	SBO1b
Oregano	Konventionell	BO12	MEA ⁺	SBO2
Oregano	Konventionell	BO14	MEA ⁺	SBO3
Oregano	Konventionell	BO18	IT	SBO4
Thymian	Ökologisch	BT3	IT	SBT1
Thymian	Ökologisch	BT3	IT	SBT1b
Thymian	Ökologisch	BT6	MEA ⁺	SBT2
Thymian	Ökologisch	BT7	OF	SBT3
Thymian	Ökologisch	BT15	IT	SBT4
Bohnenkraut	Ökologisch	BB4	IT	SBB1
Bohnenkraut	Ökologisch	BB15	IT	SBB2
Bohnenkraut	Ökologisch	BB15	OF	SBB3
Bohnenkraut	Ökologisch	BB15	OF	SBB4
Bohnenkraut	Ökologisch	BB16	IT	SBB5

MEA⁺: Malzextraktagar mit Antibiotikum, IT: Nährmedium nach VAN ITERSON, OF: Nährmedium nach OHFF und WEISSBACH

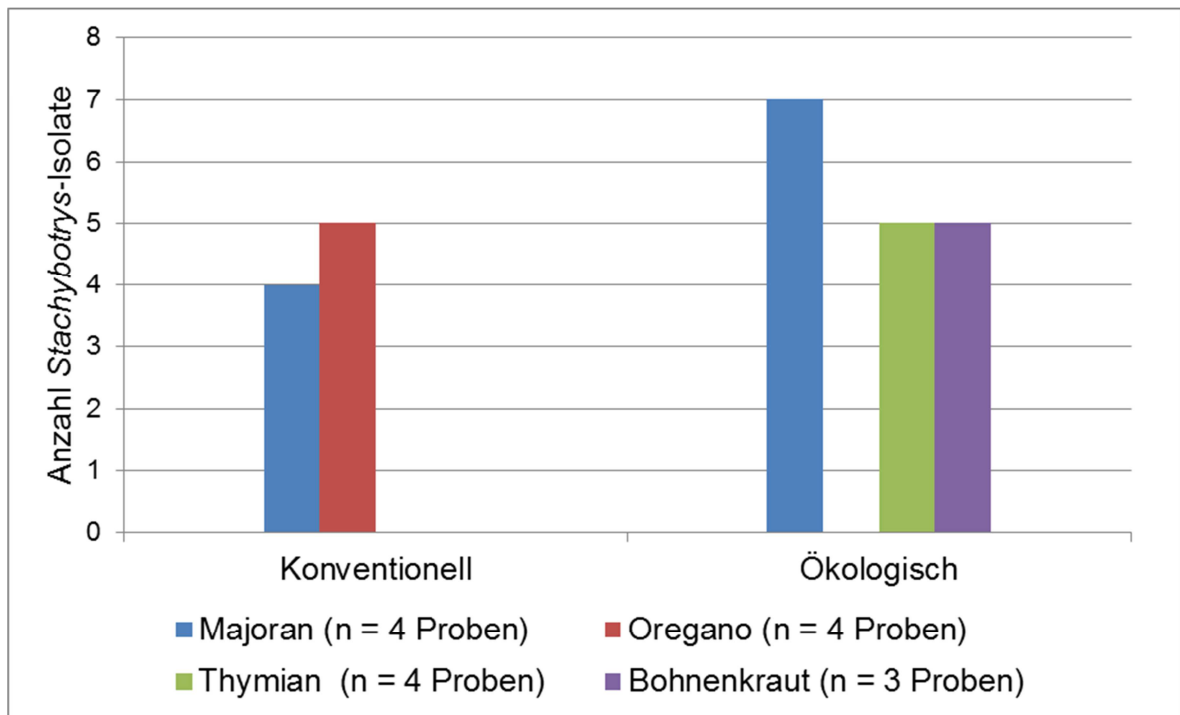


Abbildung 18: Anzahl der *Stachybotrys*-Isolate aus den einzelnen Kräuterarten

4.3 Phänotypische Charakterisierung der *Stachybotrys*-Isolate

Makroskopisch wurden Unterschiede in Größe, Farbe, Randbeschaffenheit und Textur der *Stachybotrys*-Kolonien festgestellt. Abbildungen 19-21 zeigen die unterschiedlichen Wachstumsformen von *Stachybotrys* spp. anhand drei Wochen alter Dreipunktulturen (MEA) aller Isolate aus den Kräutern.

Der Durchmesser der Kolonien variierte zwischen 2,5 cm und 4,5 cm. Nahezu alle Isolate (n = 44) zeichneten sich durch eine dunkle, grau-schwarze Koloniefarbe aus (Abbildung 19 und 20). Lediglich sechs Isolate fielen durch eine helle Erscheinungsform auf (Abbildung 21).

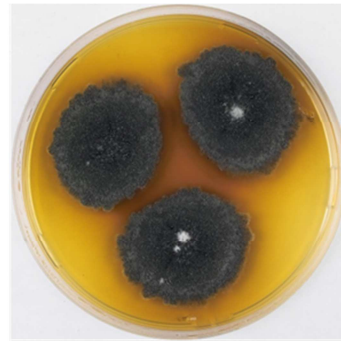
Einige Isolate bildeten gelbes (Abbildung 20, Isolat SBM6) oder schwarzes (Abbildung 20, Isolat SBM5) extrazelluläres Pigment, andere zeigten kein sichtbares extrazelluläres Pigment (Abbildung 19, Isolat SBM10).

Die Randbeschaffenheit war zumeist glatt und rund, es kamen aber auch Kolonien mit eingekerbtem oder zerfranstem Rand vor (Abbildung 19, Isolat SBO1b).

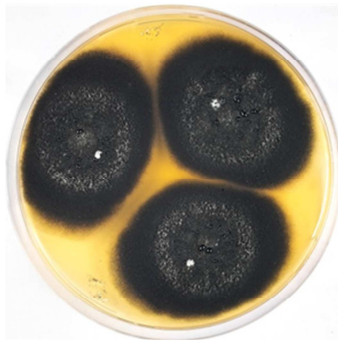
Die Oberflächen der Kolonien variierten von rasenähnlich bis schmierig oder zerklüftet und wiesen häufig Exsudat auf (Abbildung 19, Isolat SBM27).



SBM4



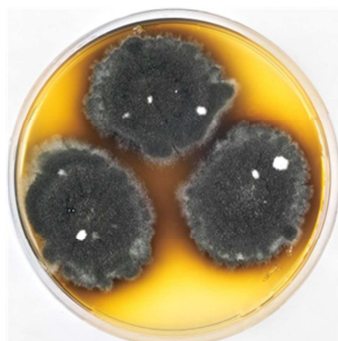
SBM7



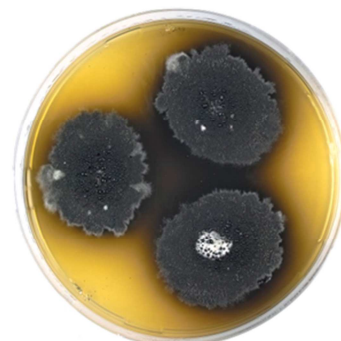
SBM10



SBM11



SBM12a



SBM14a

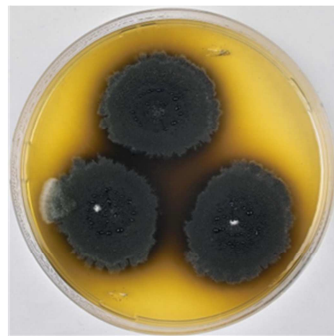


SBM15



SBM16

Abbildung 19: Kulturen mit überwiegend dunkler Erscheinungsform und größerem Koloniedurchmesser
Drei Wochen alte Dreipunktkulturen auf Malzextraktagar
SBM, SBO, SBT, SBB: Isolate aus Majoran, Oregano, Thymian bzw. Bohnenkraut



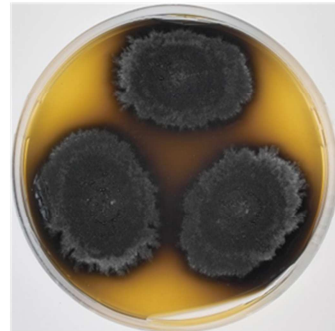
SBM17a



SBM19



SBM24



SBM25



SBM26



SBM27



SBM28

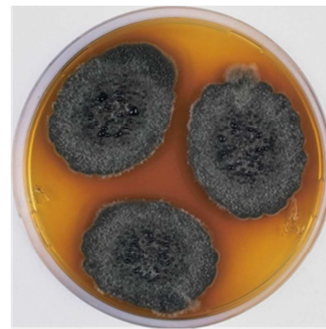


SBM29

Abbildung 19 (Fortsetzung): Kulturen mit überwiegend dunkler Erscheinungsform und größerem Koloniedurchmesser
Drei Wochen alte Dreipunktkulturen auf Malzextraktagar
SBM, SBO, SBT, SBB: Isolate aus Majoran, Oregano, Thymian bzw. Bohnenkraut



SBM30



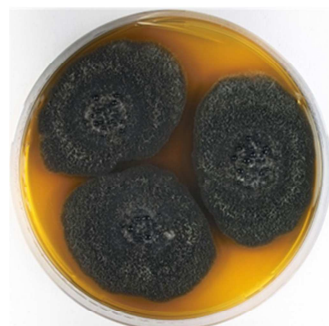
SBO1a



SBO1b



SBO2



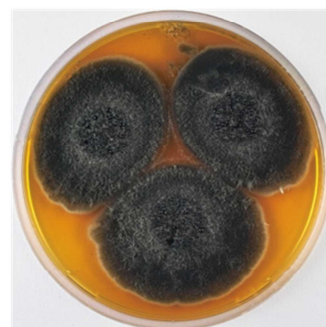
SBO3



SBO4



SBT2



SBT3

Abbildung 19 (Fortsetzung):

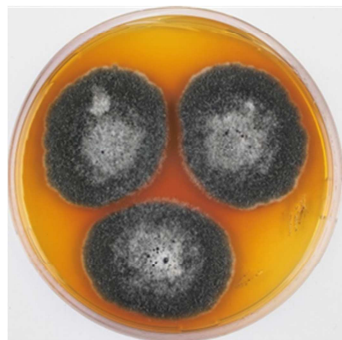
Kulturen mit überwiegend dunkler Erscheinungsform und größerem Koloniedurchmesser
 Drei Wochen alte Dreipunktkulturen auf Malzextraktagar
 SBM, SBO, SBT, SBB: Isolate aus Majoran, Oregano, Thymian bzw. Bohnenkraut



SBT4



SBB1



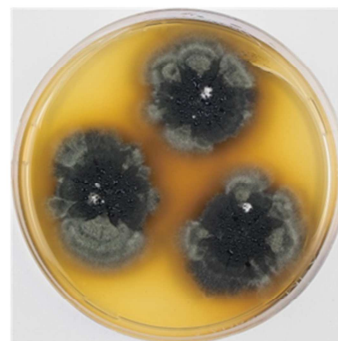
SBB2



SBB3

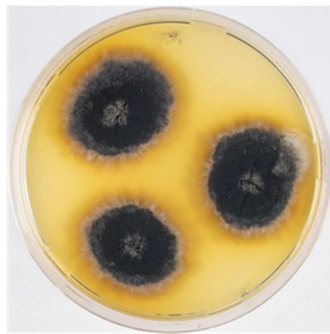


SBB4

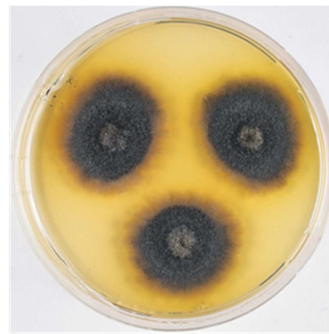


SBB5

Abbildung 19 (Fortsetzung): Kulturen mit überwiegend dunkler Erscheinungsform und größerem Koloniedurchmesser
Drei Wochen alte Dreipunktkulturen auf Malzextraktagar
SBM, SBO, SBT, SBB: Isolate aus Majoran, Oregano, Thymian bzw. Bohnenkraut



SBM1



SBM2



SBM3



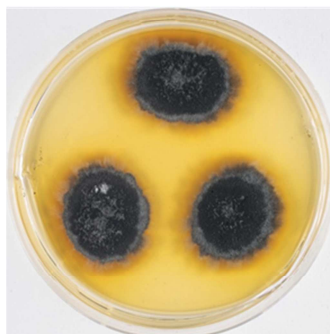
SBM5



SBM6



SBM8



SBM9a



SBM13

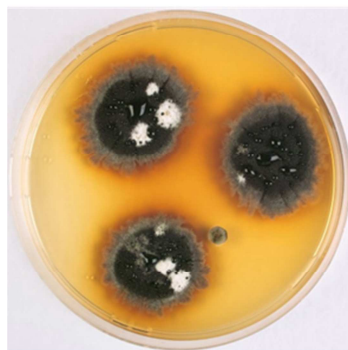
Abbildung 20: Kulturen mit überwiegend dunkler Erscheinungsform und kleinerem Koloniedurchmesser
Drei Wochen alte Dreipunktkulturen auf Malzextraktagar
SBM, SBO, SBT, SBB: Isolate aus Majoran, Oregano, Thymian bzw. Bohnenkraut



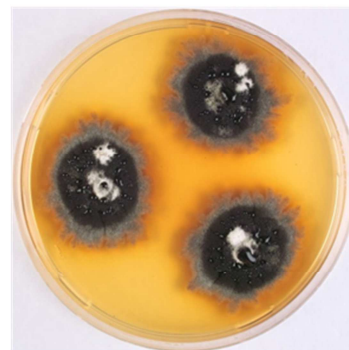
SBM18



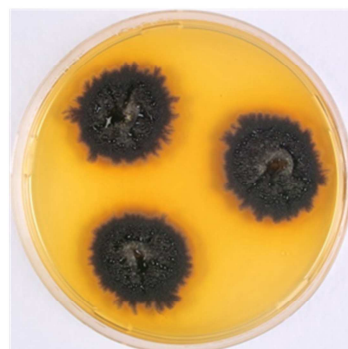
SBM20



SBM21



SBM22



SBM23



SBT1

Abbildung 20 (Fortsetzung): Kulturen mit überwiegend dunkler Erscheinungsform und kleinerem Koloniedurchmesser
Drei Wochen alte Dreipunktkulturen auf Malzextraktagar
SBM, SBO, SBT, SBB: Isolate aus Majoran, Oregano, Thymian bzw. Bohnenkraut



SBM9b



SBM12b



SBM14b



SBM17b



SBM17c



SBT1b

Abbildung 21: Kulturen mit überwiegend heller Erscheinungsform
Drei Wochen alte Dreipunktkulturen auf Malzextraktagar
SBM, SBO, SBT, SBB: Isolate aus Majoran, Oregano, Thymian
bzw. Bohnenkraut

Auch lichtmikroskopisch ließen sich Unterschiede zwischen den einzelnen Isolaten bezüglich Form, Größe und Oberfläche der Konidiophoren, Phialiden und Sporen erkennen. Abbildung 22 zeigt Aufnahmen von vier Isolaten, ebenfalls nach dreiwöchiger Anzucht auf MEA. Während bei den Isolaten SBM27 (Majoran) und SBO4 (Oregano) die Konidiophoren glatt erschienen, besaßen die Isolate SBB5

(Bohnenkraut) und SBM19 (Majoran) Konidiophoren mit rauher Oberfläche. Form und Größe der Konidien variierten ebenfalls. Es kamen Isolate mit kurzen, rundlichen Konidien ebenso vor, wie Isolate mit länglichen Konidien. Eine Spezieszuordnung war auf dieser Ebene nicht möglich.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Referenzstämme ließ Unterschiede in Form, Größe und Oberfläche der Pilzstrukturen erkennen. Die Konidien von IBT40285 (*S. chlorohalonata*) waren länger und schlanker als die Sporen von IBT40293 (*S. chartarum* Chemotyp S). Im Gegensatz dazu war die Oberfläche der Strukturen von IBT40293 rauher als die Oberfläche von IBT40285. Der Stamm IBT40288 (*S. chartarum* Chemotyp A) wies längliche, schmale Konidien mit glatter Oberfläche auf (Abbildung 23).

Eine Spezies- oder Chemotypenzuordnung war mit makroskopischen und mikroskopischen Methoden nicht möglich.

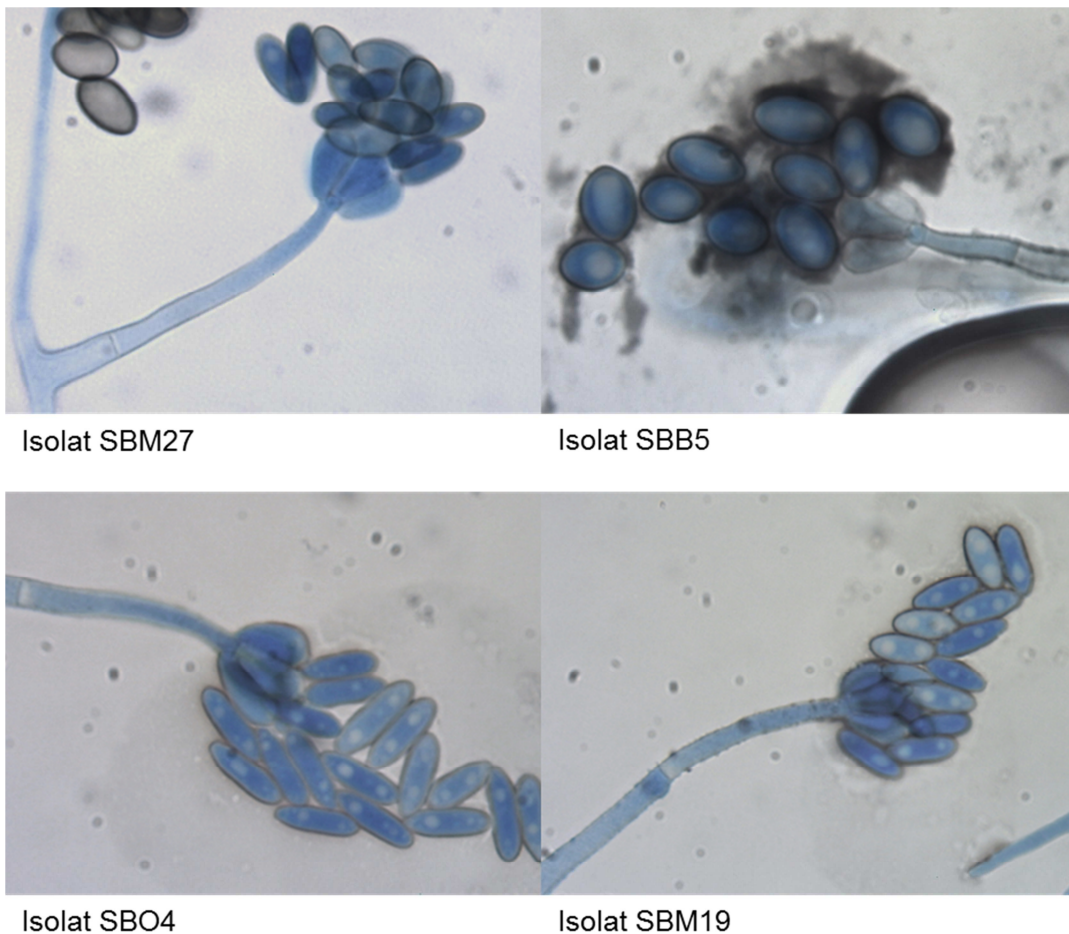


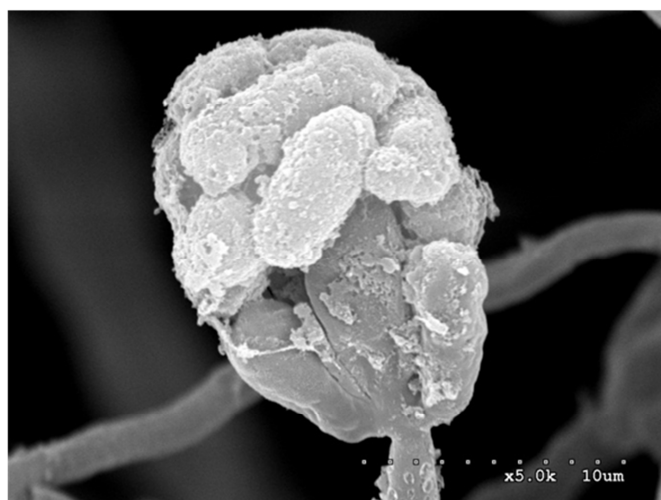
Abbildung 22: Lichtmikroskopische Aufnahmen von ausgewählten *Stachybotrys*-Isolaten (nach dreiwöchigem Wachstum auf Malzextraktagar, 1000-fache Vergrößerung)



IBT40285 (*S. chlorohalonata*)



IBT40288 (*S. chartarum* Chemotyp A)



IBT40293 (*S. chartarum* Chemotyp S)

Abbildung 23: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Referenzstämme IBT40285, IBT40288 und IBT40293 (nach dreiwöchigem Wachstum auf Malzextraktagar, 5000-fache Vergrößerung)

4.4 Bildung von Toxinen

4.4.1 MTT-Zellkulturtest

Im MTT-Zellkulturtest wurden für die Extrakte der *Stachybotrys* spp. (n = 50) unterschiedliche zytotoxische Aktivitäten gemessen (Abbildung 24). So zeigten die Extrakte sämtlicher aus Majoran isolierter *Stachybotrys* spp. (n = 35) keine (n = 20) oder nur geringe (n = 15) zytotoxische Aktivitäten. Die entsprechenden IC₅₀-Werte lagen bei $\geq 7,50$ g/ml bzw. 3,75 g/ml - 0,47 g/ml (Abbildungen 24). In Abbildung 25 sind die MTT-Testergebnisse für fünf ausgewählte Isolate dargestellt. Alle Testergebnisse finden sich in Tabelle 46 im Anhang.

Eine höhere Zytotoxizität ($< 0,47$ g/ml) wurde für die Rohextrakte von drei Isolat aus Oregano (SBO1a: 0,23 g/ml; SBO1b: 0,23 g/ml; SBO2: 0,12 g/ml) (Abbildung 26) und je einem Isolat aus Thymian (SBT3: 0,03 g/ml) (Abbildung 27) und Bohnenkraut (SBB2: 0,12 g/ml) (Abbildung 28) ermittelt.

Die restlichen Isolate dieser Kräuter unterschieden sich von den vorgenannten durch IC₅₀-Werte von 0,47 g/ml - $\geq 7,50$ g/ml (Abbildungen 24, 26-28).

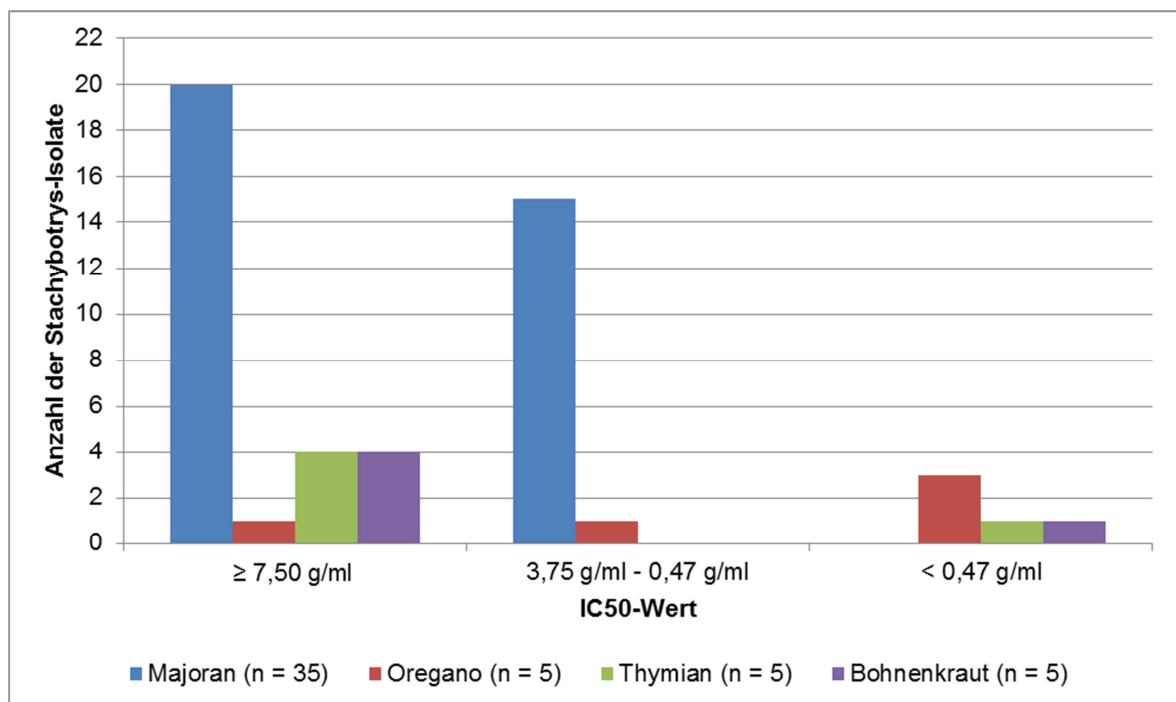


Abbildung 24: Zytotoxische Aktivitäten der *Stachybotrys*-Isolate im MTT-Zellkulturtest mit swine kidney-Targetzellen.
IC₅₀-Werte (inhibitory concentration 50): Dosis, bei der die Zellviabilität um 50 % abnimmt

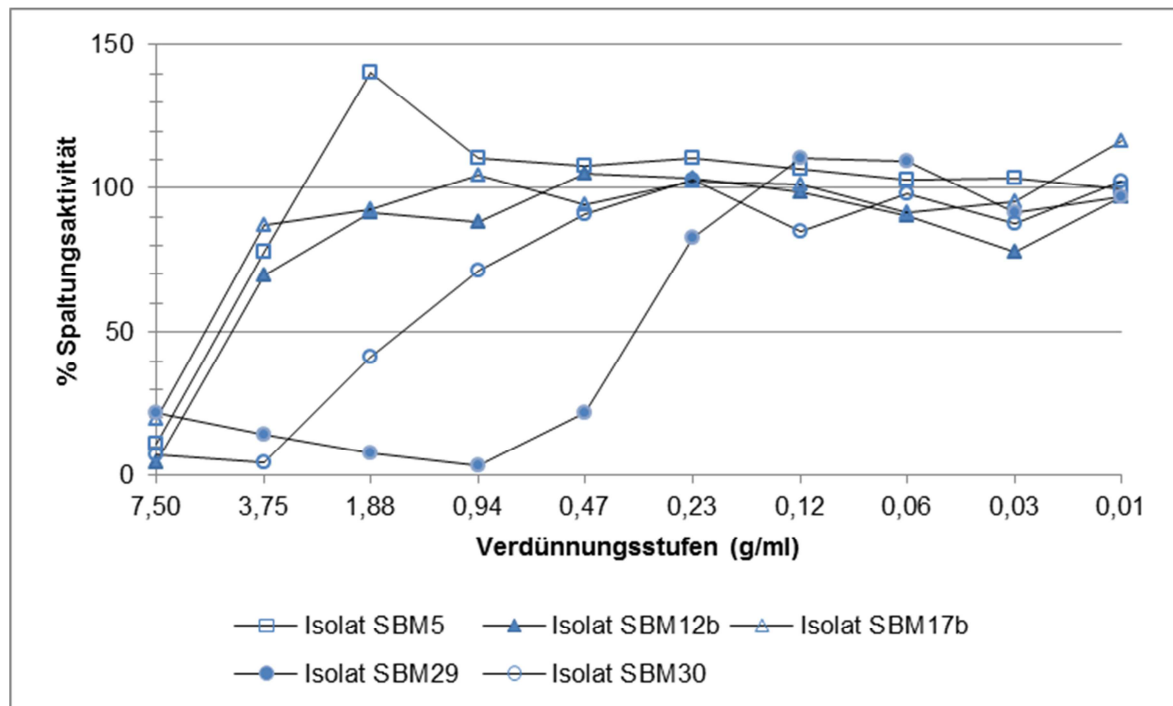


Abbildung 25: Ergebnisse des MTT-Tests ausgewählter Isolate aus Majoran (Angabe der Spaltungsaktivität in % im Vergleich zur Zellkontrolle)

IC₅₀-Wert (inhibitory concentration 50): Dosis, bei der die Zellviabilität um 50 % abnimmt

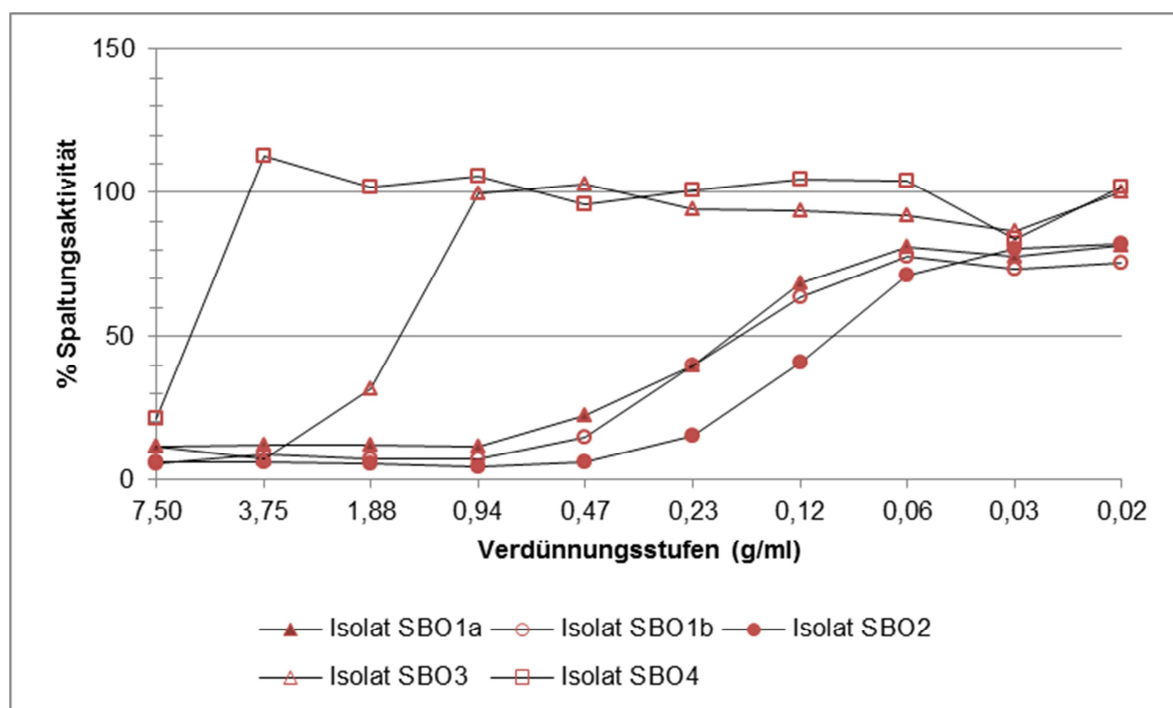


Abbildung 26: Ergebnisse des MTT-Tests der Isolate aus Oregano (Angabe der Spaltungsaktivität in % im Vergleich zur Zellkontrolle)

IC₅₀-Wert (inhibitory concentration 50): Dosis, bei der die Zellviabilität um 50 % abnimmt

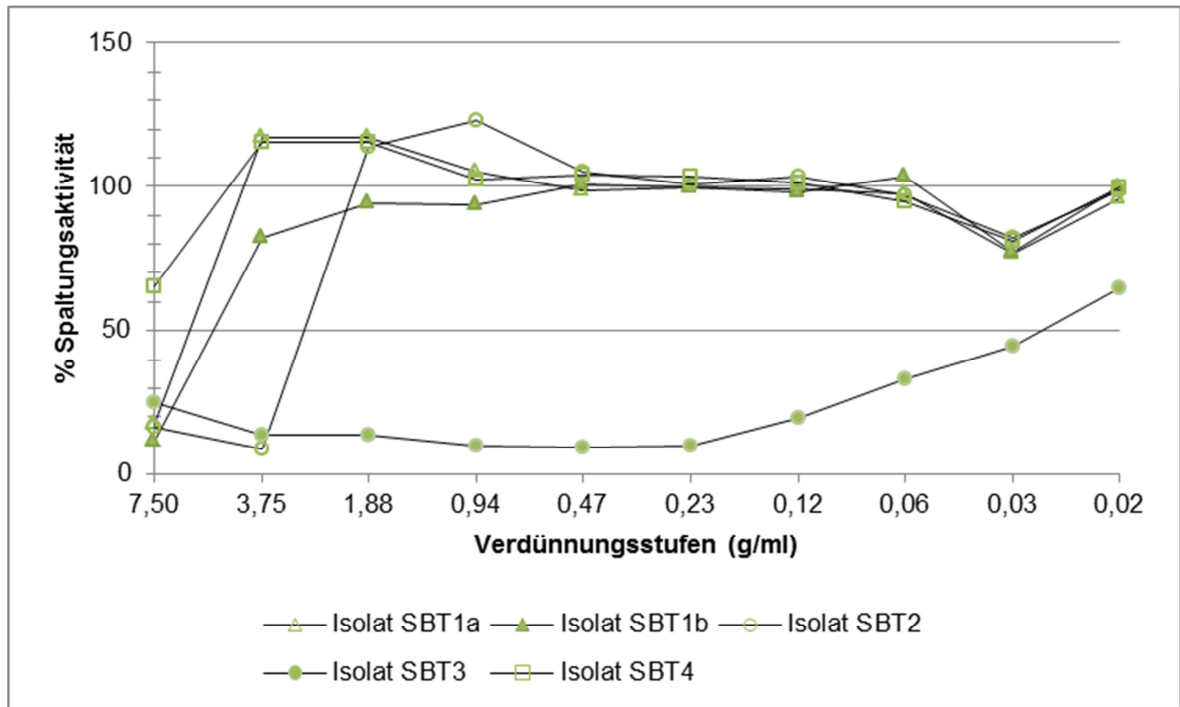


Abbildung 27: Ergebnisse des MTT-Tests der Isolate aus Thymian (Angabe der Spaltungsaktivität in % im Vergleich zur Zellkontrolle)
 IC_{50} -Wert (inhibitory concentration 50): Dosis, bei der die Zellviabilität um 50 % abnimmt

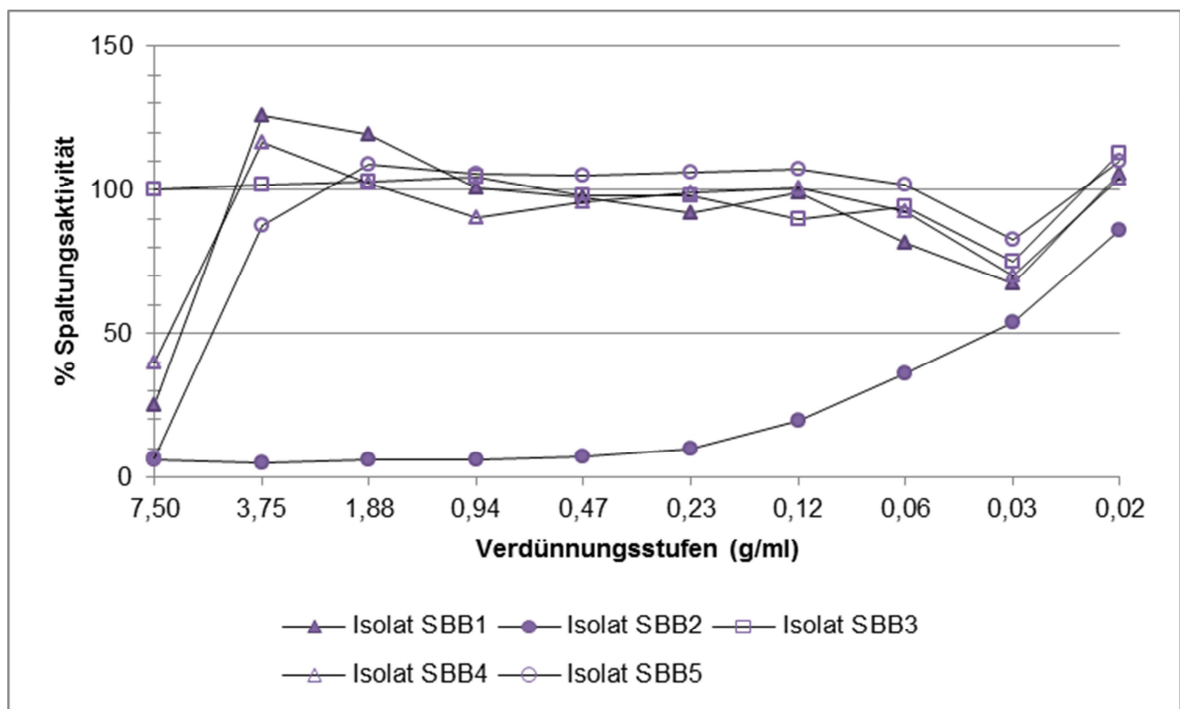


Abbildung 28: Ergebnisse des MTT-Tests der Isolate aus Bohnenkraut (Angabe der Spaltungsaktivität in % im Vergleich zur Zellkontrolle)
 IC_{50} -Wert (inhibitory concentration 50): Dosis, bei der die Zellviabilität um 50 % abnimmt

Auffallend war, dass der Referenzstamm IBT40293 (0,94 g/ml) für *S. chartarum* Chemotyp S eine vergleichsweise geringe Toxizität zeigte (Tabelle 31).

Tabelle 31: Zytotoxische Aktivität der *Stachybotrys*-Referenzstämme im MTT-Zellkulturtest mit swine kidney-Targetzellen

Isolat	Spezies	Herkunft	IC ₅₀ -Wert (g Agar/ml)
S7	<i>S. chlorohalonata</i>	Referenzstamm MRI Kulmbach	>7,50
IBT40285	<i>S. chlorohalonata</i>	Referenzstamm DTU Dänemark	7,50
S1091	<i>S. chartarum</i> Chemotyp A	Referenzstamm MRI Kulmbach	>7,50
IBT40288	<i>S. chartarum</i> Chemotyp A	Referenzstamm DTU Dänemark	>7,50
S1114	<i>S. chartarum</i> Chemotyp S	Referenzstamm MRI Kulmbach	0,23
IBT40293	<i>S. chartarum</i> Chemotyp S	Referenzstamm DTU Dänemark	0,94

IC₅₀-Wert (inhibitory concentration 50): Dosis, bei der die Zellviabilität um 50 % abnimmt

4.4.2 ELISA

Aus den ELISA-Ergebnissen geht hervor, dass die Isolate aus Majoran niedrige Messwerte von ≤1 ng/g-30 ng/g aufwiesen (Tabelle 47, Anhang).

Unter den aus Oregano isolierten Stämmen fanden sich drei toxische Stämme mit Werten über 1000 ng/g (SBO1a, SBO1b, SBO2). Der höchste Messwert wurde für das Isolat SBO1b mit 19084,25 ng Roridin A-Äquivalent/g Agar ermittelt.

In Thymian und Bohnenkraut fand sich je ein toxischer Stamm (SBT3: 5840,63 ng/g; SBB2: 1082,64 ng/g). Bei der Überprüfung der Referenzstämme von *S. chartarum* Chemotyp S wurden vergleichsweise geringe Trichothecen-gehalte gemessen (S1114: 335,41 ng/g; IBT40293: 154,38 ng/g) (Tabelle 47, Anhang). Abbildung 29 zeigt die Ergebnisse der ELISA-Messungen aller *Stachybotrys*-Isolate.

Bei den in verschiedenen Verdünnungen eingesetzten Proben wurde als Messwert immer der Wert der höchsten Verdünnungsstufe herangezogen, deren Extinktion innerhalb der Kalibrationsgeraden (0,2-18 ng/ml) lag. Damit wurde erreicht, dass Matrixeffekte weitestgehend reduziert werden konnten (z. B. Isolat SBO1b, Tabelle 47, Anhang).

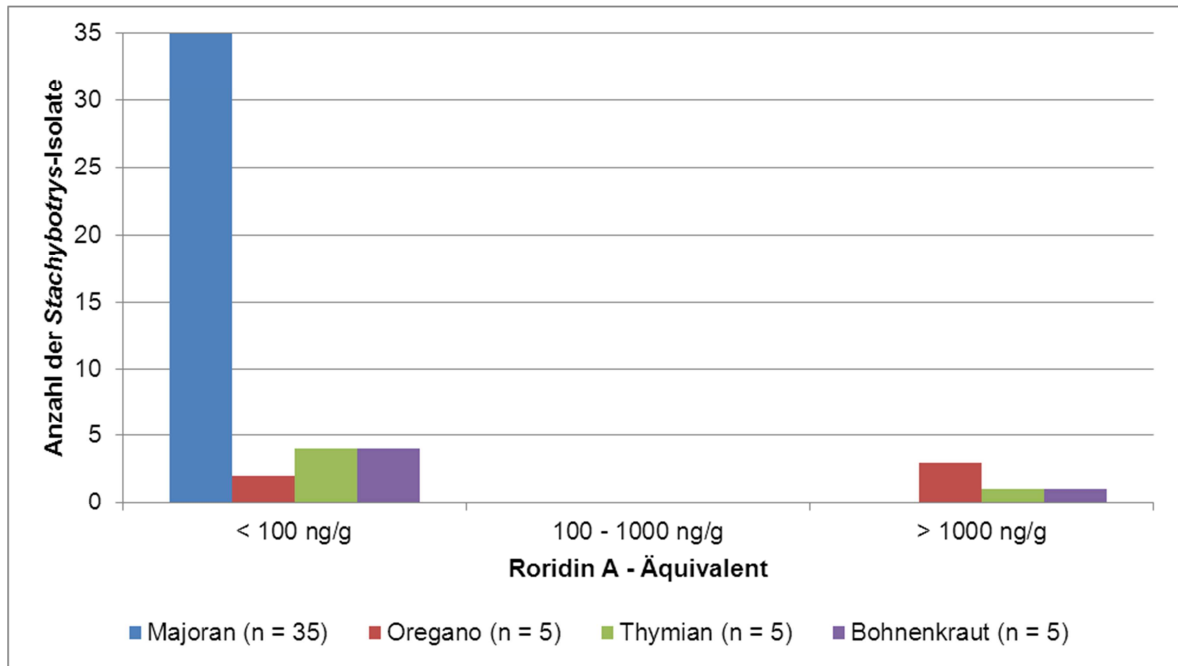


Abbildung 29: Ergebnisse der ELISA-Messungen der 50 getesteten *Stachybotrys*-Isolate. Angabe des Trichothecengehaltes in ng Roridin A-Äquivalent/g Agar.

4.4.3 LC-MS/MS

Die Retentionszeiten der untersuchten Sekundärmetabolite lagen unter den gewählten chromatographischen Bedingungen zwischen 22,2 und 26,0 min (Tabelle 32). Abbildung 30 zeigt ein Chromatogramm der mitgeführten Standardtoxine Satratoxin G und H, Verrucarin A und Roridin A. Die Methode ermöglichte eine geeignete Auftrennung der Substanzen mit symmetrischer Peakform (Abbildung 30-33).

Die Extrakte von fünf Kräuteraisolaten aus Oregano, Thymian und Bohnenkraut (SBO1a, SBO1b, SBO2, SBT3, SBB2) und der beiden Referenzstämme für *S. chartarum* Chemotyp S (S1114, IBT40293) enthielten makrozyklische Trichothecene (Tabelle 32), alle anderen waren negativ. Auffällig waren die vergleichsweise niedrigen Gehalte an makrozyklischen Trichothecenen der Referenzstämme (Tabelle 32). Keines der Isolate bildete Roridin A oder Verrucarin A, die als typische Sekundärmetabolite von *Myrothecium verrucaria* gelten (COLE et al., 2003).

Tabelle 32: LC-MS/MS-Ergebnisse der fünf positiven *Stachybotrys*-Isolate und der zwei positiven Referenzstämme

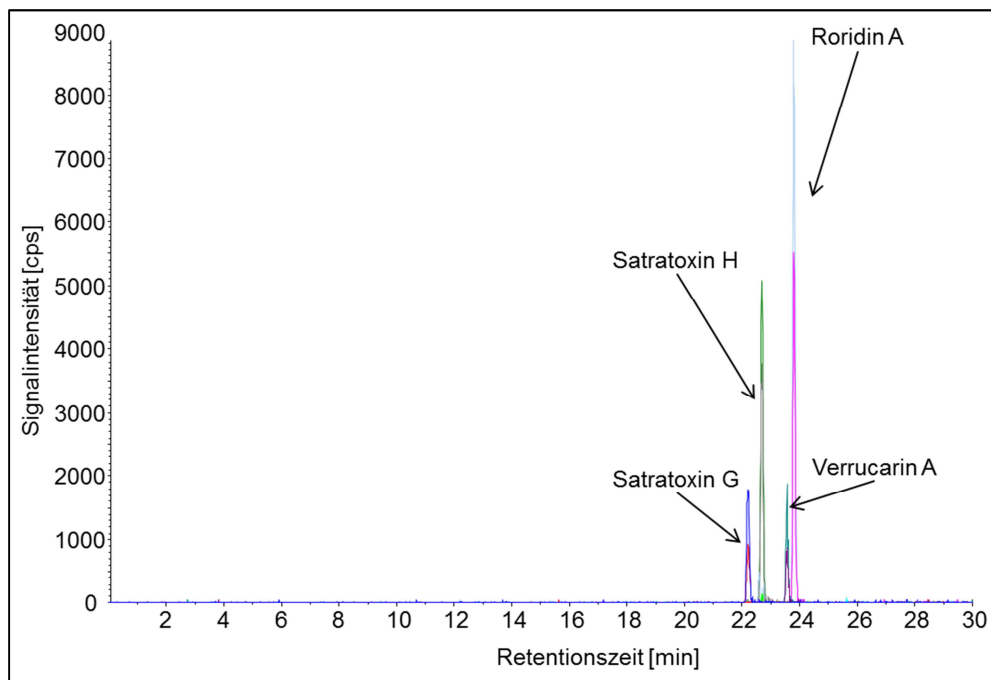
Isolat	Toxingehalt (ng/g)							
	RL-2 (21,4)*	SG (22,2)*	SH (22,7)*	SF (23,4)*	VA (23,6)*	RA (23,8)*	VJ (25,9)*	RE (26,0)*
SBO1a	+	379	159	+	-	-	+	+
SBO1b	+	356	125	+	-	-	+	+
SBO2	+	355	79	+	-	-	+	+
SBT3	+	281	62	+	-	-	+	+
SBB2	+	202	-	+	-	-	+	+
S1114	+	34	6	+	-	-	+	+
IBT40293	+	22	7	+	-	-	+	+

VJ: Verrucarín J, VA: Verrucarín A, RA: Roridin A, RE: Roridin E, RL-2: Roridin L-2, SF: Satratoxin F, SG: Satratoxin G, SH: Satratoxin H

*: Retentionszeit in Minuten

+: Qualitativer Nachweis

-: Kein Nachweis

**Abbildung 30:** Chromatogramm (LC-MS/MS) eines Standardmix (Konzentration: 100 ng/ml) von Satratoxin G und H, Roridin A und Verrucarín A

Auffällig zeigte sich das Toxinprofil des Isolates SBB2 aus Bohnenkraut, das durch ein Fehlen von Satratoxin H und eine vergleichsweise hohe Konzentration von Satratoxin F gekennzeichnet ist (Abbildung 31).

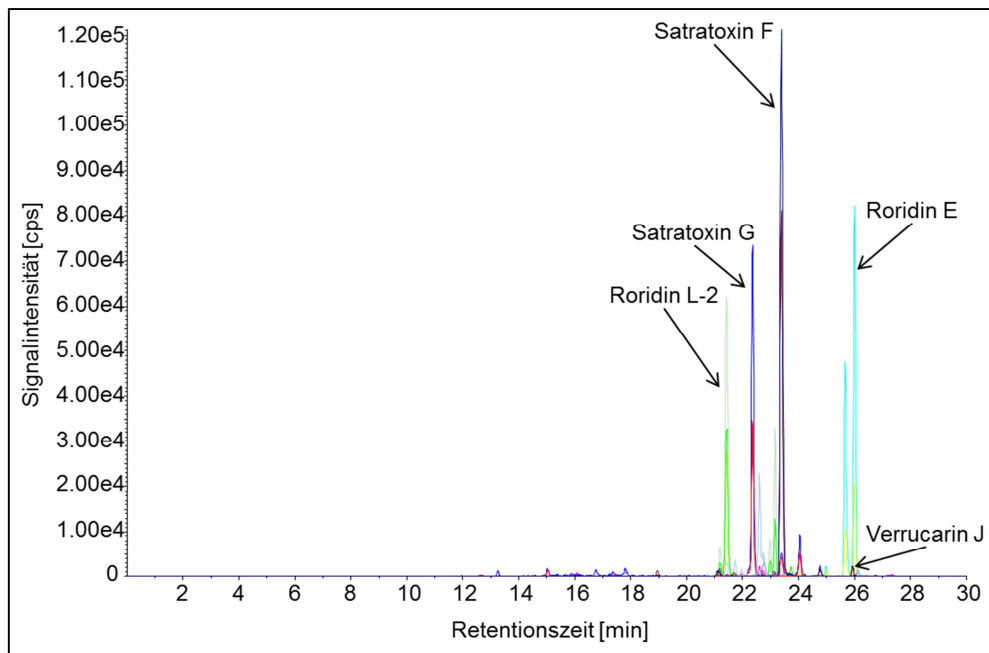


Abbildung 31: Chromatogramm (LC-MS/MS) des Isolats SBB2 aus Bohnenkraut

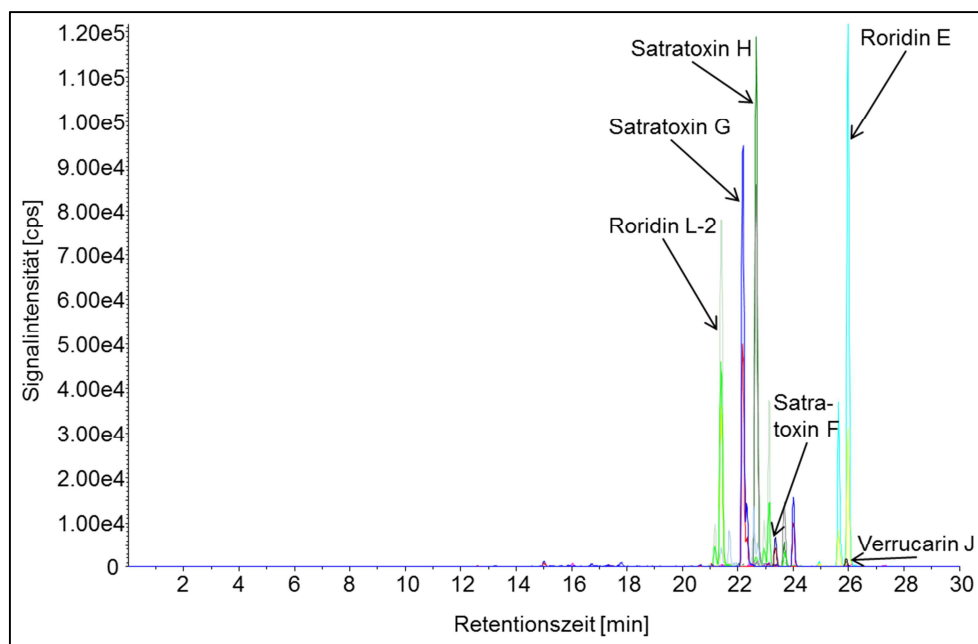


Abbildung 32: Chromatogramm (LC-MS/MS) des Isolats SBO1a aus Oregano

Ein Chromatogramm des Isolats SBO1a ist in Abbildung 32 dargestellt. Dieses lieferte ein typisches Metabolitenprofil aus den Trichothecenen Satratoxin G, H und F, Verrucarin J, Roridin L-2 und Roridin E (JARVIS et al., 1998; NIELSEN et al., 2002; GOTTSCHALK et al., 2006).

In Abbildung 33 ist das Chromatogramm eines Isolats aus Majoran dargestellt, bei dem keine für makrozyklische Trichothecene spezifischen Peaks auftraten. Die Intensitäten der gezeigten, unspezifischen Signale liegen im Vergleich zu denen der makrozyklischen Trichothecene sehr niedrig. Die Chromatogramme der Referenzstämme sind zum Vergleich in den Abbildungen 39-41 im Anhang aufgeführt.

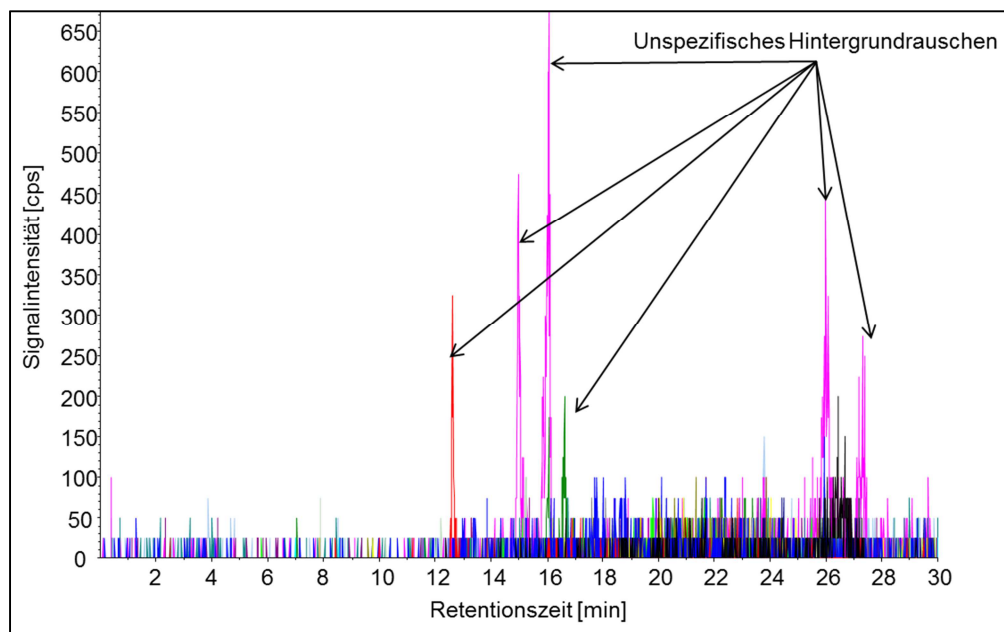


Abbildung 33: Chromatogramm (LC-MS/MS) des Isolats SBM5 aus Majoran ohne für makrozyklische Trichothecene spezifische Peaks

4.5 Genotypische Charakterisierung der *Stachybotrys*-Isolate

Für die genotypischen Charakterisierungen wurden insgesamt 15 Isolate ausgewählt, die aufgrund der zuvor erhaltenen Untersuchungsergebnisse in unterschiedliche Toxizitätsstufen eingeteilt werden konnten (Tabelle 33).

Tabelle 33: Untersuchungsergebnisse der 15 für die Sequenzierung ausgewählten *Stachybotrys*-Isolate

Kräuterart	Isolat*	IC ₅₀ -Wert (g/ml)	Roridin A-Äquivalent (ng/g)	Konzentration SG + SH (ng/g)
Majoran	SBM5	7,50	15,33	-
	SBM10	7,50	0,59	-
	SBM12b	7,50	0,47	-
	SBM17b	7,50	0,27	-
	SBM29	0,47	0,46	-
	SBM30	1,88	11,30	-
Oregano	SBO1a	0,23	1991,22	538
	SBO1b	0,23	19084,25	481
	SBO2	0,12	1784,37	434
Thymian	SBT1a	7,50	0,25	-
	SBT2	3,75	0,35	-
	SBT3	0,03	5840,63	342
Bohnenkraut	SBB2	0,06	1082,64	202
	SBB3	>7,50	0,39	-
	SBB5	7,50	0,36	-

*Zuordnung zu den Gewürzproben siehe Tabellen 38 und 39 im Anhang

IC₅₀-Wert (inhibitory concentration 50): Dosis, bei der die Zellviabilität um 50 % abnimmt

SG: Satratoxin G, SH: Satratoxin H

-: kein Nachweis

Die DNA der vier Genabschnitte ITS, Tri5, Tub2 und Chs1 (vgl. Kapitel 2.1.3) dieser Isolate sowie der Referenzstämme (n = 6) wurde mittels PCR vervielfältigt. Die Primer waren so gewählt, dass sowohl die DNA von *S. chartarum* Chemotyp A und Chemotyp S als auch von *S. chlorohalonata* trotz Sequenzunterschieden amplifiziert wurde. Anschließend wurde eine Sequenzierung der Amplifikate durchgeführt.

Die Ergebnisse der Sequenzierung und deren Abgleich mit der Vergleichsdatenbank (NCBI) ergaben, dass die Isolate SBM5, SBM10, SBM12b, SBM17b, SBM29 und SBM30 aus Majoran, die Isolate SBT1 und SBT2 aus Thymian und die Isolate

SBB3 und SBB5 aus Bohnenkraut der Spezies *S. chlorohalonata* zuzuordnen waren.

Bei den fünf Isolaten SBO1a, SBO1b und SBO2 aus Oregano, SBT3 aus Thymian und SBB2 aus Bohnenkraut handelte es sich um *S. chartarum* Chemotyp S. Keines der sequenzierten Isolate wurde als *S. chartarum* Chemotyp A identifiziert. In den Tabellen 34 und 35 sind die Ergebnisse der Sequenzierung der Genabschnitte ITS, Tri5, Tub2 und Chs1 dargestellt. Eine komplette Übereinstimmung mit der jeweiligen Vergleichssequenz ist durch ein „+“ gekennzeichnet, Abweichungen um eine Base mit „+*“ und Abweichungen um mehrere Basen mit „-“.

Die Sequenzen der Referenzstämme für *S. chartarum* Chemotyp S entsprachen den zugehörigen NCBI-Vergleichssequenzen zu 100 %, während die *S. chartarum* Chemotyp A- und die *S. chlorohalonata*-Referenzstämme eine Basenabweichung (im Chs1- bzw. im Tri5-Genabschnitt) aufwiesen. In den übrigen Genabschnitten zeigten auch sie keine Abweichungen von den entsprechenden Vergleichssequenzen.

Bei den Isolaten aus Majoran handelte es sich durchwegs um *S. chlorohalonata*, ebenso bei je zwei Isolaten aus Thymian und Bohnenkraut. Alle sequenzierten Isolate aus Oregano, so wie je ein Isolat aus Thymian und aus Bohnenkraut wurden anhand ihrer Gensequenzen eindeutig als *S. chartarum* Chemotyp S identifiziert.

Tabelle 34: Ergebnisse der Sequenzvergleiche (ITS, Tri5) der *Stachybotrys*-Isolate und der Referenzstämme mit den NCBI-Vergleichssequenzen

Isolat	ITS		Tri5		
	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chloro- halonata</i>	<i>S. chartarum</i> Chemotyp S	<i>S. chartarum</i> Chemotyp A	<i>S. chloro- halonata</i>
	AF081469.1	AF081468.2	EU288836.1	AF468154.1	AF468155.1
Referenz- stämme					
S7	-	+	-	-	+
IBT40285	-	+	-	-	+
S1091	+	-	-	+	-
IBT40288	+	-	-	+	-
S1114	+	-	+	-	-
IBT40293	+	-	+	-	-
Majoran					
SBM5	-	+	-	-	+
SBM10	-	+	-	-	+
SBM12b	-	+	-	-	+
SBM17b	-	+	-	-	+
SBM29	-	+	-	-	+
SBM30	-	+	-	-	+
Oregano					
SBO1a	+	-	+	-	-
SBO1b	+	-	+	-	-
SBO2	+	-	+	-	-
Thymian					
SBT1	-	+	-	-	+
SBT2	-	+	-	-	+
SBT3	+	-	+	-	-
Bohnenkraut					
SBB2	+	-	+	-	-
SBB3	-	+	-	-	+
SBB5	-	+	-	-	+

+: 100 % Übereinstimmung mit der Vergleichssequenz

+*: Ein Basenaustausch gegenüber der Vergleichssequenz

-: Keine Übereinstimmung

Tabelle 35: Ergebnisse der Sequenzvergleiche (Tub2, Chs1) der *Stachybotrys*-Isolate und der Referenzstämmen mit den NCBI-Vergleichssequenzen

Isolat	Tub2			Chs1	
	<i>S. chartarum</i>	<i>S. chloro- halonata</i>	<i>S. chartarum</i> Chemotyp S	<i>S. chartarum</i> Chemotyp A	<i>S. chloro- halonata</i>
	AF468156.1	AF468157.1	EU288798.1	AF468158.1	AF468159.1
Referenz- stämmen					
S7	-	+	-	-	+
IBT40285	-	+	-	-	+
S1091	+	-	-	+	-
IBT40288	+	-	-	+	-
S1114	+	-	+	-	-
IBT40293	+	-	+	-	-
Majoran					
SBM5	-	+	-	-	+
SBM10	-	+	-	-	+
SBM12b	-	+	-	-	+
SBM17b	-	+	-	-	+
SBM29	-	+	-	-	+
SBM30	-	+	-	-	+
Oregano					
SBO1a	+	-	+	-	-
SBO1b	+	-	+	-	-
SBO2	+	-	+	-	-
Thymian					
SBT1	-	+	-	-	+
SBT2	-	+	-	-	+
SBT3	+	-	+	-	-
Bohnenkraut					
SBB2	+	-	+	-	-
SBB3	-	+	-	-	+
SBB5	-	+	-	-	+

+: 100 % Übereinstimmung mit der Vergleichssequenz

+*: Ein Basenaustausch gegenüber der Vergleichssequenz

-: Keine Übereinstimmung

Im Genabschnitt ITS unterschieden sich die Isolate von *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* an einer Stelle. Eine Differenzierung der beiden Chemotypen von *S. chartarum* war anhand dieser Gensequenz nicht möglich (Abbildung 34).

Im Genabschnitt Tri5 lagen 20 Basenunterschiede zwischen *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* vor. *S. chartarum* Chemotyp A und Chemotyp S wiesen einen Basenaustausch auf, wodurch zwischen den beiden Chemotypen unterschieden werden konnte. Abbildung 35 zeigt einen Ausschnitt aus dieser Gensequenz.

Acht *S. chlorohalonata*-Isolate und die zwei Referenzstämme unterschieden sich an einer Position der Tri5-Sequenz von der NCBI-Sequenz für *S. chlorohalonata*, nur zwei (SBM12b, SBB5) stimmten überein (Tabelle 34, Abbildung 36). Es ist fraglich, ob es sich dabei nur um Fehler bei der Sequenzierung handeln kann, da sowohl die Referenzstämme als auch ein Großteil der Isolate betroffen waren. Bei dem Isolat SBM17b lag der Basenaustausch nicht wie bei den übrigen Isolaten an Position 153, sondern an Position 136 vor (Abbildung 36).

Der Genabschnitt Tub2 wies 27 Basensubstitutionen zwischen *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* auf (Ausschnitt in Abbildung 37), wodurch die beiden Spezies zweifelsfrei identifiziert werden konnten, die *S. chartarum*-Chemotypen waren nicht differenzierbar.

Für den Genabschnitt Chs1 wurden insgesamt elf Basensubstitutionen zwischen den beiden *Stachybotrys*-Spezies festgestellt, die beiden Chemotypen von *S. chartarum* wichen an zwei Positionen voneinander ab (Ausschnitt in Abbildung 38).

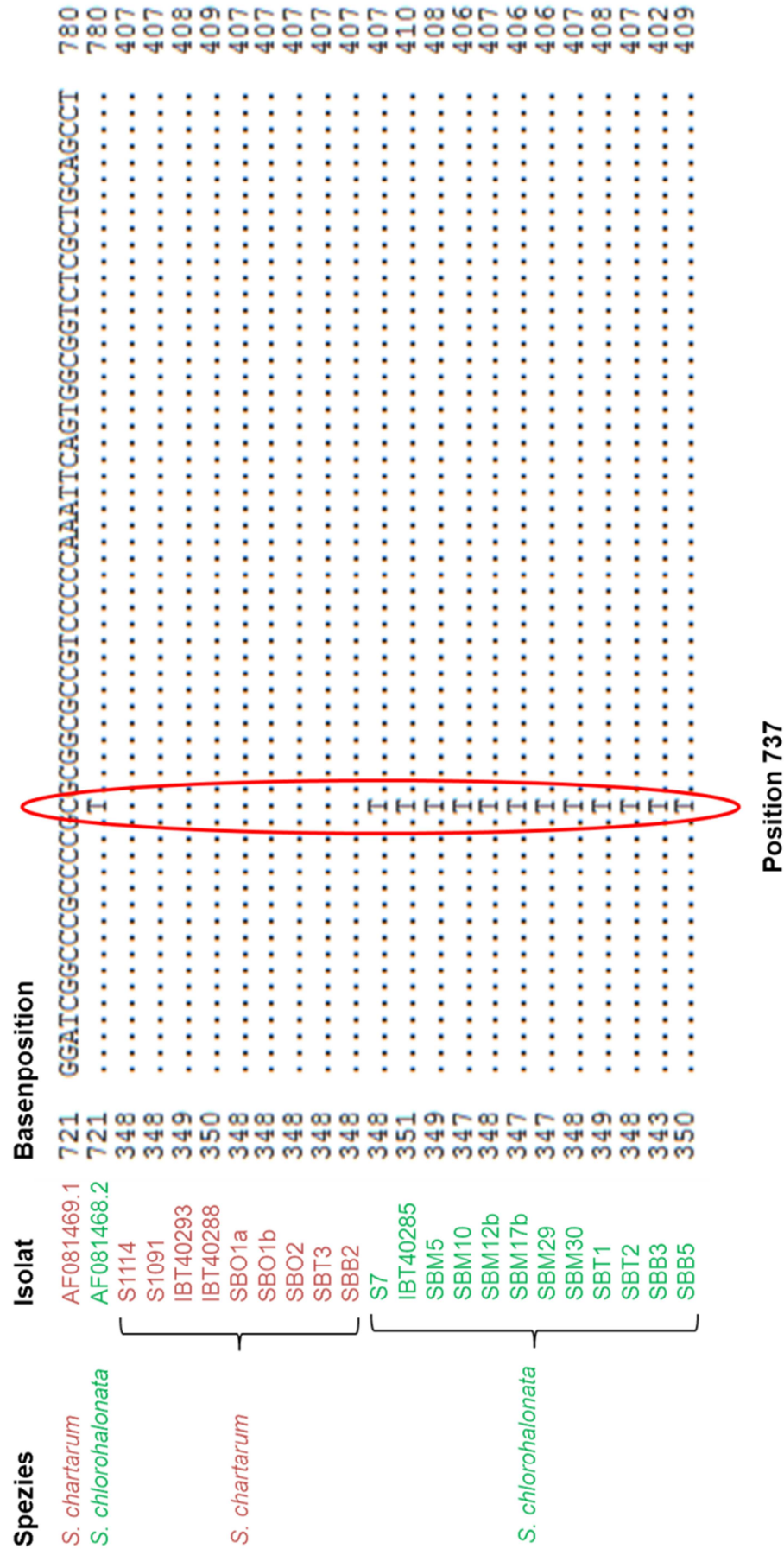


Abbildung 34: Ausschnitt aus der Gensequenz ITS der *Stachybotrys*-Isolate mit Darstellung der Basensubstitution an Position 737 der NCBI-Sequenz AF081469.1
Die *S. chlorohalonata*-Isolate (grün) unterscheiden sich an dieser Position von den *S. chartarum*-Isolaten (rot).

Spezies	Isolat	Basenposition	Position 272	Position 278
<i>S. chartarum</i> Chemotyp S	EU288836.1	241	TTTCCAAGGAGCTCATGGCAGATCTCAGCATCCACTACACCTACACTCTCATCTCGA	T
	AF468154.1	278
	AF468155.1	278
	S1114	282
	IBT40293	280
<i>S. chartarum</i> Chemotyp S	SBO1a	278
	SBO1b	282
	SBO2	279
	SBT3	282
	SBB2	279
<i>S. chartarum</i> Chemotyp A	S1091	280
	IBT40288	281
	S7	280
	IBT40285	279
	SBM5	278
<i>S. chlorohalonata</i>	SBM10	277
	SBM12b	273
	SBM17b	279
	SBM29	276
	SBM30	257
<i>S. chlorohalonata</i>	SBT1	279
	SBT2	278
	SBB3	280
	SBB5	277

Abbildung 35: Ausschnitt aus der Gensequenz Tri5 der *Stachybotrys*-Isolate mit Darstellung ausgewählter Basensubstitutionen (2 von 20) an den Positionen 272 und 278 der NCBI-Sequenz EU288836.1

Die *S. chartarum* Chemotyp A-Isolate (blau) unterscheiden sich an Position 278 von den *S. chartarum* Chemotyp S-Isolaten (rot) und den *S. chlorohalonata*-Isolaten (grün). Die *S. chlorohalonata*-Isolate (grün) unterscheiden sich an Position 272 von den *S. chartarum* Chemotyp S-Isolaten (rot) und den *S. chartarum* Chemotyp A-Isolaten (blau).

Spezies	Isolat	Basenposition		
<i>S. chlorohalonata</i>	AF468155.1	121	AGGGAGGAGCGGTTGAAAATCTTCAGTAATGCTTACAACAAGGCTGCGGCTCATTTGCA	180
	S7	123T.....	182
	IBT40285	122T.....	181
	SBM5	121T.....	180
	SBM10	120T.....	179
<i>S. chlorohalonata</i>	SBM12b	116	175
	SBM17b	122A.....	181
	SBM29	119T.....	178
	SBM30	100T.....	159
	SBT1	122T.....	181
	SBT2	121T.....	180
	SBB3	123T.....	182
	SBB5	120	179
			Position 136	Position 153

Abbildung 36: Darstellung der Basensubstitution (Position 153) der *S. chlorohalonata*-Isolate aus den Kräutern sowie der *S. chlorohalonata*-Referenzstämme im Vergleich zur Tri5-NCBI-Sequenz AF468155.1 (*S. chlorohalonata*)
Das Isolat SBM17b aus Majoran zeigt eine von den übrigen Isolaten abweichende Basensubstitution an Position 136, die Isolate SBM12b (Majoran) und SBB5 (Bohnenkraut) stimmen als einzige mit der NCBI-Sequenz überein.

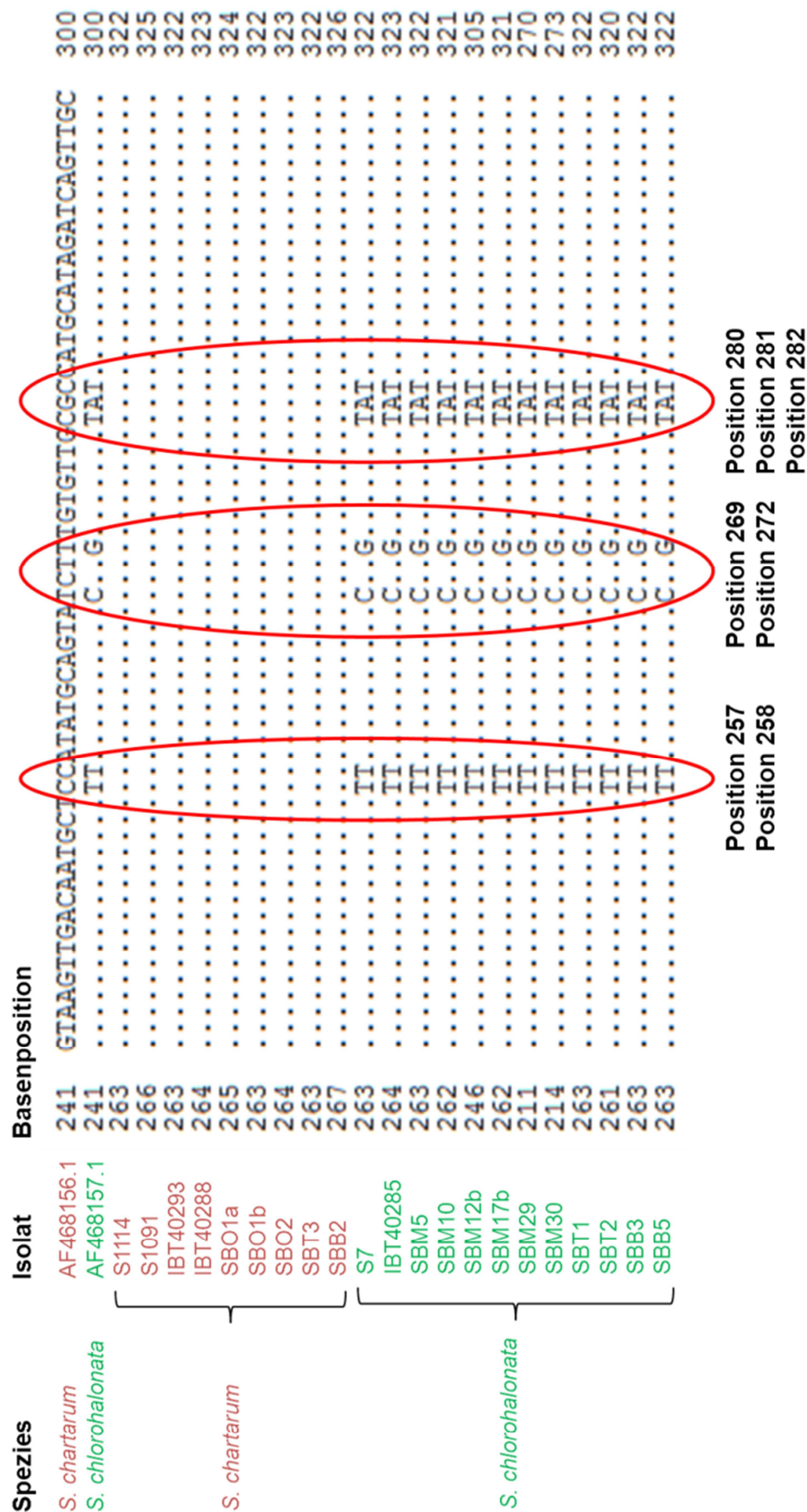


Abbildung 37: Ausschnitt aus der Gensequenz Tub2 der *Stachybotrys*-Isolate mit Darstellung ausgewählter Basensubstitutionen (7 von 27) an den Positionen 257, 258, 269, 272, 280, 281 und 282 der NCBI-Sequenz AF468156.1. Die *S. chlorohalonata*-Isolate (grün) unterscheiden sich an diesen Positionen von den *S. chartarum*-Isolaten (rot).

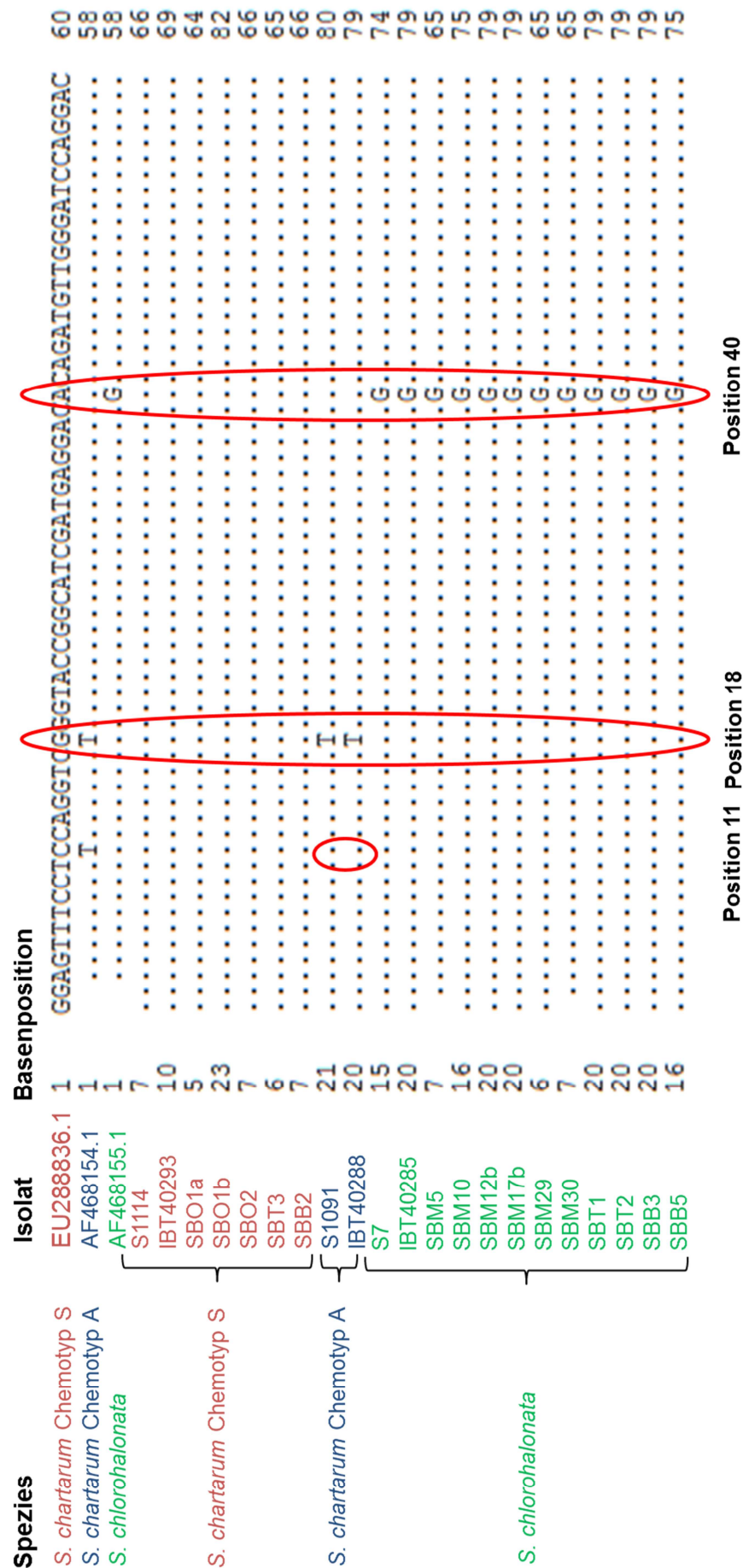


Abbildung 38: Ausschnitt aus der Gensequenz Chs1 der *Stachybotrys*-Isolate mit Darstellung ausgewählter Basensubstitutionen (2 von 11) an den Positionen 18 und 40 der NCBI-Sequenz EU288798.1

Die *S. chartarum* Chemotyp A-Isolate (blau) unterscheiden sich an Position 18 von den *S. chartarum* Chemotyp S-Isolaten (rot) und den *S. chlorohalonata*-Isolaten (grün). Die *S. chlorohalonata*-Isolate (grün) unterscheiden sich an Position 40 von den *S. chartarum* Chemotyp S-Isolaten (rot) und den *S. chartarum* Chemotyp A-Isolaten (blau). Position 11 zeigt einen Basenunterschied zwischen den *S. chartarum* Chemotyp A-Isolaten und der zugehörigen NCBI-Sequenz.

4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 50 *Stachybotrys*-Isolate, die aus vier verschiedenen Arten von Kräutern gewonnen werden konnten, mit unterschiedlichen Methoden näher untersucht.

Neben der phänotypischen Charakterisierung (Kultur- und Mikromorphologie) wurden zytotoxische Effekte von Rohextrakten im MTT-Zellkulturtest und die Bildung von makrozyklischen Trichothecenen mittels ELISA und LC-MS/MS untersucht. Von 15 ausgewählten Isolaten wurde eine Genotypisierung mittels PCR und Sequenzierung durchgeführt.

Der Vergleich der Ergebnisse in Tabelle 36 zeigt, dass die sechs verwendeten Referenzstämme sich bei allen eingesetzten Verfahren wie erwartet verhielten. Die beiden *S. chartarum* Chemotyp S-Stämme waren im Bioassay toxisch, positiv im ELISA und wurden als Bildner von makrozyklischen Trichothecenen mittels LC-MS/MS bestätigt. Im Unterschied dazu waren die *S. chartarum* Chemotyp A- und die *S. chlorohalonata*-Stämme weder zytotoxisch noch wurden mittels ELISA und LC-MS/MS makrozyklische Trichothecene detektiert.

Die 15 ausgewählten und sequenzierten *Stachybotrys*-Isolate aus Kräutern setzten sich aus fünf *S. chartarum* Chemotyp S und zehn *S. chlorohalonata* zusammen. Auch bei diesen Isolaten wurden, mit Ausnahme eines Isolates, sehr gute Übereinstimmungen für die einzelnen Untersuchungsergebnisse gefunden. *S. chartarum* Chemotyp S-Isolate waren sowohl im Bioassay toxisch, positiv im ELISA und zur Bildung von mindestens fünf unterschiedlichen makrozyklischen Trichothecenen befähigt, was mittels LC-MS/MS nachgewiesen werden konnte.

Lediglich bei einem *S. chlorohalonata*-Isolat (SBM29) fiel ein mittelgradig zytotoxischer Befund auf, der sich aufgrund der Begleitmessungen nicht durch makrozyklische Trichothecene erklären lässt.

Tabelle 36: Zusammenfassende Darstellung aller Ergebnisse der sequenzierten *Stachybotrys*-Isolate und der Referenzstämme

Isolat	Herkunft des Isolats	MTT-Test	ELISA	LC-MS/MS	Sequenzierung
		IC ₅₀ -Wert (g/ml)	Roridin A-Äquivalent (ng/g)	SG+SH-Gehalt (ng/g)*	<i>Stachybotrys</i> spp.
S7	Stroh	>7,50	0,51	-	<i>S. chlorohalonata</i>
IBT40285	Baumaterial	7,50	0,26	-	<i>S. chlorohalonata</i>
S1091	Rigips	>7,50	9,03	-	<i>S. chartarum</i> Chemotyp A
IBT40288	Baumaterial	>7,50	0,46	-	<i>S. chartarum</i> Chemotyp A
S1114	Gipsplatte	0,23	335,41	40	<i>S. chartarum</i> Chemotyp S
IBT40293	Baumaterial	0,94	154,38	30	<i>S. chartarum</i> Chemotyp S
SBM5	Majoran	7,50	15,33	-	<i>S. chlorohalonata</i>
SBM10	Majoran	7,50	0,59	-	<i>S. chlorohalonata</i>
SBM12b	Majoran	7,50	0,47	-	<i>S. chlorohalonata</i>
SBM17b	Majoran	7,50	0,27	-	<i>S. chlorohalonata</i>
SBM29	Majoran	0,47	0,46	-	<i>S. chlorohalonata</i>
SBM30	Majoran	1,88	11,30	-	<i>S. chlorohalonata</i>
SBO1a	Oregano	0,23	1991,22	538	<i>S. chartarum</i> Chemotyp S
SBO1b	Oregano	0,23	19084,25	481	<i>S. chartarum</i> Chemotyp S
SBO2	Oregano	0,12	1784,37	434	<i>S. chartarum</i> Chemotyp S
SBT1	Thymian	7,50	0,25	-	<i>S. chlorohalonata</i>
SBT2	Thymian	3,75	0,35	-	<i>S. chlorohalonata</i>
SBT3	Thymian	0,03	5840,63	342	<i>S. chartarum</i> Chemotyp S
SBB2	Bohnenkraut	0,06	1082,64	202	<i>S. chartarum</i> Chemotyp S
SBB3	Bohnenkraut	>7,50	0,39	-	<i>S. chlorohalonata</i>
SBB5	Bohnenkraut	7,50	0,36	-	<i>S. chlorohalonata</i>

IC₅₀-Wert (inhibitory concentration 50): Dosis, bei der die Zellviabilität um 50 % abnimmt

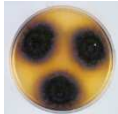
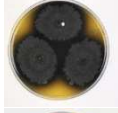


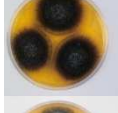


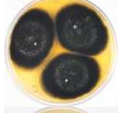

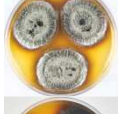
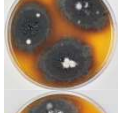

SG: Satratoxin G, SH: Satratoxin H

*Isolate, die SG und SH bildeten, wiesen auch Roridin L-2, Satratoxin F, Verrucaridin J und Roridin E auf, für diese Metabolite fand jedoch keine Quantifizierung statt.

-: kein Nachweis von SG und SH


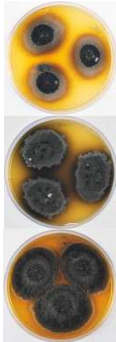
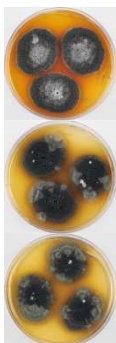
Eine Gegenüberstellung der phänotypischen und genotypischen Befunde der 15 sequenzierten Isolate sowie der Referenzstämme findet sich in Tabelle 37. Hierbei ist zu erkennen, dass es einerseits Isolate gab, die mit den Vergleichssequenzen übereinstimmten, die jedoch im Phänotyp ein auffälliges Bild zeigten (z. B. Isolat SBM12b aus Majoran). Andererseits kamen auch Isolate mit veränderter Gensequenz vor, die eine für *Stachybotrys* spp. typische Kulturmorphologie (vgl. Kapitel 2.1.2) aufwiesen (z. B. Isolat SBM10 aus Majoran). Das Isolat SBM17b (Majoran) unterschied sich in der Sequenz des Tri5-Genabschnittes von der Vergleichssequenz und zeigte zusätzlich ein verändertes Koloniebild.

Tabelle 37: Vergleich der phänotypischen und genotypischen Merkmale der 15 sequenzierten *Stachybotrys*-Isolate

Isolat	Dreipunktkultur	Spezies	Abweichung von NCBI-Vergleichssequenzen
Referenzstämme			
S7		<i>S. chlorohalonata</i>	Tri5, Position 153
IBT40285		<i>S. chlorohalonata</i>	Tri5, Position 153
S1091		<i>S. chartarum</i> Chemotyp A	Chs1, Position 11
IBT40288		<i>S. chartarum</i> Chemotyp A	Chs1, Position 11
S1114		<i>S. chartarum</i> Chemotyp S	Kein Basenaustausch
IBT40293		<i>S. chartarum</i> Chemotyp S	Kein Basenaustausch
Majoran			
SBM5		<i>S. chlorohalonata</i>	Tri5, Position 153
SBM10		<i>S. chlorohalonata</i>	Tri5, Position 153
SBM12b		<i>S. chlorohalonata</i>	Kein Basenaustausch
SBM17b		<i>S. chlorohalonata</i>	Tri5, Position 136
SBM29		<i>S. chlorohalonata</i>	Tri5, Position 153
SBM30		<i>S. chlorohalonata</i>	Tri5, Position 153

Chs1, Tri5: Genabschnitte (vgl. Kapitel 2.1.3)

Tabelle 37 (Fortsetzung): Vergleich der phänotypischen und genotypischen Merkmale der 15 sequenzierten *Stachybotrys*-Isolate

Isolat	Dreipunktkultur	Spezies	Abweichung von NCBI-Vergleichssequenzen
Oregano			
SBO1a		<i>S. chartarum</i> Chemotyp S	Kein Basenaustausch
SBO1b		<i>S. chartarum</i> Chemotyp S	Kein Basenaustausch
SBO2		<i>S. chartarum</i> Chemotyp S	Kein Basenaustausch
Thymian			
SBT1		<i>S. chlorohalonata</i>	Tri5, Position 153
SBT2		<i>S. chlorohalonata</i>	Tri5, Position 153
SBT3		<i>S. chartarum</i> Chemotyp S	Kein Basenaustausch
Bohnenkraut			
SBB2		<i>S. chartarum</i> Chemotyp S	Kein Basenaustausch
SBB3		<i>S. chlorohalonata</i>	Tri5, Position 153
SBB5		<i>S. chlorohalonata</i>	Kein Basenaustausch

Chs1, Tri5: Genabschnitte (vgl. Kapitel 2.1.3)

5 DISKUSSION

Aus 80 untersuchten Kräuterproben (Majoran, Oregano, Thymian und Bohnenkraut) wurden insgesamt 53 unterschiedliche Schimmelpilzgattungen sowie Streptomyceten und Hefen isoliert. Am häufigsten wurden dabei *Aspergillus* spp., *Eurotium* spp., *Penicillium* spp. und *Rhizopus* spp. gefunden. 15 der 80 Kräuterproben waren mit *Stachybotrys* spp. belastet. Dabei handelte es sich um vier Majoran-, vier Oregano-, vier Thymian- und drei Bohnenkrautproben. Insgesamt wurden aus diesen Proben 26 *Stachybotrys* spp. isoliert, elf davon stammten aus Majoranproben, jeweils fünf aus den übrigen Kräutern.

In der Literatur finden sich kaum Angaben zur mykogenen Belastung der genannten Kräuter, Gattungsdifferenzierungen fehlen völlig. Für Pfeffer und andere Gewürze findet sich eine ähnliche mykogene Mikrobiota wie bei den in dieser Arbeit untersuchten Kräutern. *Aspergillus* spp. gehören auch bei diesen Gewürzen zu den dominanten Gattungen (ELSHAFIE et al., 2002; MANDEEL, 2005; HASHEM und ALAMRI, 2010). Die Diversität der mykogenen Mikrobiota lässt sich durch das bodennahe Wachstum und die anschließende Ernte und Trocknung der Kräuter, die häufig am Boden und unter mangelhaften hygienischen Bedingungen stattfindet, erklären (SCHWEIGGERT et al., 2007).

Während ein Großteil der Proben eine mykogene Gesamtkeimzahl von $10\text{-}10^5$ KbE/g aufwies, lag die Belastung bei 18 Proben unterhalb der Nachweisgrenze von 10 KbE/g. Diese Kräuter waren laut DGHM bezüglich des Vorkommens von Schimmelpilzen als zufriedenstellend zu beurteilen. Lediglich in fünf Proben erreichte die mykogene Gesamtkeimzahl Werte, die über dem Richtwert von 10^5 KbE/g lagen (ANONYMOUS, 2011a).

Die Gründe für die unterschiedlich hohe Belastung der Kräuterarten können vielfältig sein. Herkunft, Ernteverfahren, Klimabedingungen zum Erntezeitpunkt sowie die Verarbeitung der Gewürze können eine Rolle spielen (ANONYMOUS, 2013e). Weiterhin können ätherische Öle der Gewürze sowie andere Inhaltsstoffe zu einer unterschiedlich hohen Belastung mit Schimmelpilzen führen (CARMO et al., 2008). Auch eventuelle Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Schimmelpilzgattungen und/oder mit anderen Mikroorganismen sind in Betracht zu ziehen. In dieser Arbeit wurden *Stachybotrys* spp. nur aus Proben mit einer

mykogenen Gesamtkeimzahl von 10^3 KbE/g und höher isoliert. Trotz seines relativ langsamen Wachstums kann dieser Pilz offensichtlich doch mit den übrigen Mikroorganismen konkurrieren.

Einflüsse der unterschiedlichen landwirtschaftlichen Erzeugungsweise (konventionell/ökologisch) waren weder in Hinblick auf die mykogene Gesamtkeimzahl noch auf die Isolation von *Stachybotrys* spp. zu erkennen. So stammten alle *Stachybotrys*-Isolate aus Thymian und Bohnenkraut aus ökologisch erzeugten Proben, während alle Isolate aus Oregano und die Mehrzahl der Isolate aus Majoran in Proben aus konventioneller Erzeugung gefunden wurden.

Für die mykologische Untersuchung wurden verschiedene Nährmedien verwendet, um die unterschiedlichen Nährstoff- und a_w -Wert-Ansprüche der verschiedenen Schimmelpilzgattungen zu erfüllen. Die besten Isolierungsraten wurden mit MEA⁺ in Kombination mit DG-18 erzielt. Die Kombination dieser Nährmedien mit der Filterpapiermethode empfiehlt sich, da auf diese Weise auch zellulolytische Pilze wie *Stachybotrys* spp. isoliert werden und somit eine möglichst breite Erfassung der mykogenen Mikrobiota erreicht wird. Die Isolierungsraten von *Stachybotrys* spp. auf den unterschiedlichen Nährmedien decken sich mit Ergebnissen in der Literatur. Auch KLUWE (2006) erzielte die besten Isolierungserfolge mit der Filterpapiermethode nach BATA et al. (1985) in Verbindung mit den Nährmedien nach VAN ITERSON (FORGACS und CARLL, 1962) und nach OHFF und WEISSBACH (OHFF und WEISSBACH, 1984).

MEA⁺ ist zur Isolierung von *Stachybotrys* spp. weniger geeignet, da es häufig zu Überwucherung durch andere, schneller wachsende Schimmelpilze kommt und vorhandene *Stachybotrys* spp. somit nicht erkannt werden (FORGACS und CARLL, 1962; HINTIKKA, 1977a). Dieses Nährmedium wurde hauptsächlich zur Erfassung der mykogenen Gesamtbelastung verwendet. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch *Stachybotrys* spp. ($n = 6$) auf MEA⁺ isoliert werden können.

Die phänotypische Charakterisierung der *Stachybotrys*-Isolate über die Gattungsebene hinaus stellte sich als schwierig dar. Eine von ANDERSEN et al. (2003) und SAMSON (2010) beschriebene Regelmäßigkeit in Größe, Farbe und Textur der Kolonien, anhand derer zwischen *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* unterschieden werden könnte, war im Zuge dieser Arbeit nicht nachvollziehbar. Während die *S. chartarum*-Isolate weitestgehend den Beschreibungen von

SAMSON (2010) entsprachen (vgl. Tabelle 37), konnte bei den *S. chlorohalonata*-Isolaten keine Regelmäßigkeit in der Kulturmorphologie der Kolonien (ANDERSEN et al., 2003; SAMSON, 2010) festgestellt werden.

Auffällig war zudem, dass einige Isolate bei Subkultivierung aus derselben Ursprungskolonie zu einem späteren Zeitpunkt unterschiedliche Kulturmorphologie bei gleichen Anzuchtbedingungen zeigten. Möglicherweise hat die Aufbewahrung der Isolate bei Kühlschranktemperaturen (MEA-Schrägagarrröhrchen) einen Einfluss auf deren Koloniebild bei Neuanzucht. Derartige Einflüsse auf die Wachstumsbiologie von *Stachybotrys* spp. sind bisher weitgehend unerforscht.

Auch auf mikroskopischer Ebene waren Unterschiede in der Morphologie der Isolate erkennbar. Diese erlaubten jedoch ebenso wenig eine sichere Zuordnung zu den einzelnen Spezies wie die kulturmorphologischen Merkmale. So kamen z. B. sowohl *S. chlorohalonata*-Isolate vor, deren Sporen eher schlank und länglich waren, als auch solche, die wie bei ANDERSEN et al. (2003) und SAMSON (2010) beschrieben, breit-ovale Sporen besaßen.

Eine deutlich verlässlichere Unterscheidung war anhand der Beurteilung der Metabolitenbildung der Isolate möglich. Mit dem wirkungsbezogenen Zellkulturtest wurde die Zytotoxizität der *Stachybotrys*-Isolate überprüft. Diese gibt einen Hinweis auf das Vorhandensein makrozyklischer Trichothecene, da das Testsystem besonders empfindlich für diese Toxine ist. Eine qualitative Bestimmung der einzelnen Toxine ist mit dem MTT-Zellkulturtest nicht möglich, da dieser Test die gesamte zytotoxische Aktivität eines Rohextraktes erfasst. Auf diese Weise können direkte Effekte von Extrakten auf Zielzellen bestimmt werden (GAREIS, 2006).

Alle Isolate aus Majoran waren nicht bis gering toxisch und nur aus Oregano (SBO1a, SBO1b, SBO2), Thymian (SBT3) und Bohnenkraut (SBB2) wurden Isolate mit hoher zytotoxischer Aktivität ermittelt (vgl. Kapitel 4.4.1, Abbildung 24).

Die unterschiedliche Toxizität der Isolate lässt bereits darauf schließen, dass es sich um unterschiedliche Chemotypen oder Spezies (ANDERSEN et al., 2002; NIELSEN et al., 2002; ANDERSEN et al., 2003) handeln könnte, da makrozyklische Trichothecene (*S. chartarum* Chemotyp S) deutlich zytotoxischer sind als Atranone und Phenylspirodrimane (*S. chartarum* Chemotyp A, *S. chlorohalonata*) (JARVIS et al., 1995; NIELSEN et al., 2002; GAREIS, 2006).

Mittels der ELISA-Messungen wurde überprüft, ob die Toxizität eines Isolats tatsächlich auf das Vorhandensein makrozyklischer Trichothecene zurückzuführen war. Die niedrigen Messwerte der Isolate aus Majoran, die umgerechnet einer Konzentration von <1 ng/g - 30 ng/g Roridin A-Äquivalent entsprachen, waren als negativ einzustufen. Der Vergleich mit den Testergebnissen der LC-MS/MS hat gezeigt, dass es sich dabei nicht um makrozyklische Trichothecene, sondern um unspezifische Matrixeffekte handelte. Daher sollte ein Cut off-Wert festgelegt werden, um falsch positive Ergebnisse auszuschließen.

Die bereits im Zellkulturtest aufgefallenen Isolate aus Oregano (SBO1a, SBO1b, SBO2), Thymian (SBT3) und Bohnenkraut (SBB2) bildeten makrozyklische Trichothecene in Konzentrationen von über 1000 ng Roridin A-Äquivalent/g Agar.

Beim Vergleich der Ergebnisse der unterschiedlichen Verdünnungsstufen eines Isolates (vgl. Tabelle 46, Anhang) wurden zum Teil hohe Abweichungen festgestellt. Die gemessenen Gehalte nahmen mit höherer Verdünnung zu. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass aufgrund der Verdünnung Matrixbestandteile in geringerer Konzentration in den Extrakten vorhanden waren und der Test sensibler für die Zielanalyten wurde.

Mittels LC-MS/MS wurden bei Isolaten aus Oregano (SBO1a, SBO1b, SBO2), Thymian (SBT3) und Bohnenkraut (SBB2) quantitativ und qualitativ makrozyklische Trichothecene nachgewiesen. Die Messergebnisse aller anderen Isolate waren negativ.

Bei vier Isolaten wurde ein identisches, für *S. chartarum* Chemotyp S bekanntes Metabolitenprofil makrozyklischer Trichothecene gefunden. Dieses besteht hauptsächlich aus den Satratoxinen G und H, Roridin L-2 und Roridin E. Verrucarin J und Satratoxin F werden nur in geringen Mengen gebildet (ANDERSEN et al., 2002; JARVIS, 2003; GOTTSCHALK et al., 2006). Das Isolat SBB2 aus Bohnenkraut wies ein davon abweichendes Metabolitenprofil auf. Es war kein Satratoxin H nachweisbar, der Peak für Satratoxin F war jedoch auffällig hoch. Da dieses Isolat in der Sequenzierung eindeutig als *S. chartarum* Chemotyp S identifiziert wurde, zeigt sich, dass auch innerhalb eines Chemotyps ein uneinheitliches Toxinprofil vorhanden sein kann. Allerdings ist nicht bekannt, ob die beobachteten Unterschiede im Toxinprofil tatsächlich auf genetischer Ebene codiert sind oder ob äußere Einflüsse eine Rolle spielen. Erklärbar wären diese

Unterschiede des Toxinprofils ebenso durch epigenetische Mechanismen, bei denen es sich um Veränderungen an den Chromosomen handelt, ohne dass dabei die Gensequenzen geändert werden. Dies kann u. a. durch DNA-Methylierung oder Histon-Modifikation geschehen. Durch die Veränderungen kommt es zu einer An- oder Abschaltung von Genen. Diese Mechanismen wurden bereits für verschiedene *Aspergillus* spp. und *Fusarium* spp. im Bezug auf ihre Toxinproduktion beschrieben (WOLOSHUK und SHIM, 2013).

Auffallend bei allen drei Untersuchungsmethoden zur Bestimmung der Toxinogenität war die Tatsache, dass die fünf toxinbildenden Isolate trotz identischer Anzucht- und Untersuchungsbedingungen weit höhere Toxizität aufwiesen, als die beiden Referenzstämme für *S. chartarum* Chemotyp S, IBT40293 und S1114. Letzterer hatte in früheren Untersuchungen (KLUWE, 2006) höhere Toxizität gezeigt als in der vorliegenden Arbeit. Es ist allerdings aus der Literatur bekannt, dass Laborstämme von *Stachybotrys* spp. aufgrund wiederholter Subkultivierung veränderte Eigenschaften bezüglich ihres Metabolitenprofils aufweisen können. So variierte z. B. die Bildung von einfachen Trichothecenen bei *S. chlorohalonata*-Isolaten nach Subkultivierung (ANDERSEN et al., 2002; ANDERSEN et al., 2003).

Die endgültige Differenzierung auf Speziesebene und Einordnung in Chemotypen erfolgte molekularbiologisch. Die hierfür verwendeten PCR-Protokolle erwiesen sich als stabil und lieferten für alle untersuchten Isolate ausreichend Amplifikat zur Sequenzierung.

Die Sequenzierung bestätigte, dass es sich bei den fünf toxinbildenden Isolaten (SBO1a, SBO1b, SBO2, SBT3, SBB2) um Vertreter von *S. chartarum* Chemotyp S handelte. Alle Sequenzen stimmten mit den von HAUGLAND und HECKMAN (1998) und CRUSE et al. (2002) in der NCBI-Datenbank hinterlegten Vergleichssequenzen überein und konnten eindeutig zugeordnet werden. Alle weiteren sequenzierten Isolate (n = 10) stellten sich als *S. chlorohalonata* heraus. *S. chartarum* Chemotyp A wurde unter den sequenzierten Isolaten nicht gefunden. Die beiden Referenzstämme für *S. chartarum* Chemotyp A wiesen im Genabschnitt Chs1 einen Basenaustausch im Vergleich zur zugehörigen NCBI-

Sequenz auf. Bei acht *S. chlorohalonata*-Isolaten und den zwei Referenzstämmen für *S. chlorohalonata* fiel ein Basenaustausch im Tri5-Genabschnitt im Vergleich zur NCBI-Vergleichssequenz auf. Derartige Abweichungen sind in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Die auffälligen phänotypischen Merkmale, wie z. B. bei Isolat SBM17b (vgl. Tabelle 37), sind möglicherweise darauf zurückzuführen, dass es sich um bislang nicht näher beschriebene Spezies oder Chemotypen handeln kann.

Allerdings lassen - wie eingangs bereits diskutiert - die beobachteten phänotypischen Diversitäten keine belastbaren Rückschlüsse auf die Spezies zu. Es ließ sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der phänotypischen Ausprägung einzelner Isolate und Abweichungen auf genetischer Ebene feststellen. So zeigten Isolate mit typischer Kulturmorphologie einen Unterschied im Tri5-Genabschnitt, andere Isolate mit auffälliger Kulturmorphologie wiesen hingegen keinerlei Abweichungen in den untersuchten Genabschnitten auf (vgl. Tabelle 37).

Die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungsmethoden der *Stachybotrys*-Isolate stimmten gut überein. Gleiches zeigten Ergebnisse von KLUWE (2006), die ebenfalls *Stachybotrys*-Isolate mit unterschiedlichen Methoden untersucht hatte. Isolate mit erhöhter Zytotoxizität im MTT-Test wiesen auch in ELISA und LC-MS/MS eine Bildung von makrozyklischen Trichothecenen auf. Lediglich bei einem Isolat (SBM29 aus Majoran) konnte die zytotoxische Aktivität, die höher lag als bei einem Referenzstamm für *S. chartarum* Chemotyp S, nicht auf die Bildung von makrozyklischen Trichothecenen zurückgeführt werden. Um zu klären, welche Metaboliten für diese Zytotoxizität verantwortlich sind, müssen in weiteren Untersuchungen chemische Analysen durchgeführt werden. Die Sequenzierung bestätigte, dass es sich bei allen Produzenten von makrozyklischen Trichothecenen um *S. chartarum* Chemotyp S handelte (Tabelle 36). Die niedrigen Messwerte der *S. chlorohalonata*-Isolate in MTT-Test und ELISA lassen sich auf Matrixeffekte zurückführen, in der LC-MS/MS wurden keine makrozyklischen Trichothecene nachgewiesen.

Insgesamt wurden Abweichungen zu den Daten aus der Literatur sowohl im Hinblick auf den Phänotyp und das Metabolitenprofil, als auch auf den Genotyp gefunden. Diese Abweichungen lassen darauf schließen, dass sich unter den *Stachybotrys*-Isolaten aus Kräutern möglicherweise neue Spezies bzw. Chemotypen befinden. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den

Ergebnissen der Sequenzierung, der Toxinogenität und den phänotypischen Erscheinungsbildern im Detail zu überprüfen, sind weitere mykologische Untersuchungen und die Sequenzierung weiterer Genabschnitte erforderlich.

Mithilfe der angewandten Methoden konnte erstmals gezeigt werden, dass toxinogene *S. chartarum* in getrockneten Kräutern vorkommen und dass diese als potentielle Vektoren für den Eintrag des Schimmelpilzes und eventuell dessen Sekundärmetaboliten in Lebensmittel eingestuft werden müssen. Die Präsenz von makrozyklischen Trichothecenen in den Kräutern wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Hierfür sollten weitere wissenschaftliche Studien durchgeführt werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Stachybotrys (S.) chartarum ist ein ubiquitär vorkommender Schimmelpilz, der in der Lage ist, diverse Sekundärmetabolite, darunter die hochtoxischen makrozyklischen Trichothecene, zu bilden. Sein zellulolytisches Potential befähigt ihn besonders, sowohl auf welkendem Pflanzenmaterial wie Heu und Stroh, als auch auf Tapeten und anderen zellulosehaltigen Baumaterialien zu wachsen und unter entsprechenden Bedingungen auch Sekundärmetabolite zu bilden. Somit stellt er eine Gesundheitsgefahr für Menschen und Tiere dar.

Über das Vorkommen von *S. chartarum* und seine Sekundärmetabolite in Lebensmitteln fehlen bisher Untersuchungen. Deshalb war es Ziel dieser Arbeit, ausgewählte getrocknete Kräuter auf das Vorkommen toxinogener *Stachybotrys* spp. zu untersuchen und eine mögliche Gefahr des Eintrags von makrozyklischen Trichothecenen über den Vektor „getrocknete Kräuter“ in Lebensmittel aufzuzeigen.

Insgesamt wurden 50 *Stachybotrys*-Isolate, die neben 52 weiteren Schimmelpilzgattungen aus vier verschiedenen Arten von Kräutern (Majoran, Oregano, Thymian und Bohnenkraut, insgesamt n = 100) gewonnen werden konnten, mit unterschiedlichen Methoden näher untersucht. Neben der phänotypischen Charakterisierung wurden zytotoxische Effekte von Rohextrakten im MTT-Zellkulturttest und die Bildung von makrozyklischen Trichothecenen mittels ELISA und LC-MS/MS gemessen. Von 15 ausgewählten Isolaten wurde eine Genotypisierung mittels PCR und Sequenzierung durchgeführt.

Die Mehrzahl der Isolate zeigte keine Bildung von makrozyklischen Trichothecenen. Fünf Isolate (10 %) waren jedoch hochtoxisch im MTT-Zellkulturttest und die Bildung von Satratoxinen und anderen makrozyklischen Trichothecenen konnte mittels ELISA und LC-MS/MS nachgewiesen werden. Diese fünf Isolate wurden genotypisch als *S. chartarum* Chemotyp S bestätigt.

In dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass toxinogene *S. chartarum* in getrockneten Kräutern vorkommen können und auch fähig sind, sich bei geeigneten Anzuchtbedingungen zu vermehren und Toxine zu bilden. Inwiefern von *S. chartarum* gebildete makrozyklische Trichothecene über den Vektor „getrocknete Kräuter“ in Lebensmittel eingetragen werden, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

7 SUMMARY

Stachybotrys (S.) chartarum is an omnipresent mould which may produce secondary metabolites, such as the highly toxic macrocyclic trichothecenes. Its potential to lyse cellulose enables growth not only on wilting plants such as hay and straw but also on wallpapers and several other cellulose containing construction materials. Thus, *S. chartarum* poses a risk for likewise human and animal health.

The prevalence of *S. chartarum* and its secondary metabolites in food is still unknown. Thus, the objective of the present study was to examine selected dried culinary herbs on the presence of toxigenic *Stachybotrys* spp. and to determine the potential risk of entry of macrocyclic trichothecenes via the vector dried culinary herbs into the food chain.

In total, 50 isolates of *Stachybotrys*, which were found in four different types of herbs (marjoram, oregano, thyme, and savory) besides 52 further species of mould, were examined using different methods. In addition to phenotypic characterization cytotoxic effects of the crude extracts were determined using MTT cell culture test and the production of macrocyclic trichothecenes was measured using ELISA and LC-MS/MS. Furthermore, 15 selected isolates were genotyped using PCR and sequenced.

Most of the isolates did not show any production of macrocyclic trichothecenes. Yet, five isolates (10%) were highly toxic in the MTT cell culture test and the production of satratoxin and further macrocyclic trichothecenes could be proven using ELISA and LC-MS/MS. These five isolates were genotypically confirmed as *S. chartarum* chemotype S.

This is the first study showing that toxigenic *S. chartarum* may be present in dried herbs which may be capable of proliferating and producing toxins under suitable conditions. Further studies need to assess the risk of entry of macrocyclic trichothecenes into food via dried herbs.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- ALTMAN, F.P., 1976. Tetrazolium salts and formazans. *Progr. Histochem. Cytochem.*, 1-56.
- ANDERSEN, B., NIELSEN, K.F., JARVIS, B.B., 2002. Characterization of *Stachybotrys* from water-damaged buildings based on morphology, growth, and metabolite production. *Mycologia* 94, 392-403.
- ANDERSEN, B., NIELSEN, K.F., THRANE, U., SZARO, T., TAYLOR, J.W., JARVIS, B.B., 2003. Molecular and phenotypic descriptions of *Stachybotrys chlorohalonata* sp nov and two chemotypes of *Stachybotrys chartarum* found in water-damaged buildings. *Mycologia* 95, 1227-1238.
- ANDERSEN, B., NISSEN, A.T., 2000. Evaluation of media for detection of *Stachybotrys* and *Chaetomium* species associated with water-damaged buildings. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46, 111-116.
- ANDERSSON, M.A., NIKULIN, M., KÖLJALG, U., ANDERSSON, M.C., RAINEY, F., REIJULA, K., HINTIKKA, E.L., SALKINOJA-SALONEN, M., 1997. Bacteria, molds, and toxins in water-damaged building materials. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 387-393.
- ANONYMOUS, 1998. Leitsätze für Gewürze und andere würzende Zutaten, in der Fassung vom 27. Mai 1998, Bek. v. 25. 8. 1998 (GMBI S. 577).
- ANONYMOUS, 2002a. Beschluss des Bundeskartellamts. http://www.bundeskartellamt.de/wDeutsch/download/pdf/Kartell/Kartell03/B2_12_00.pdf. Zugriff am: 10.03.2013.
- ANONYMOUS, 2002b. Entscheidung der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen (Bekannt gegeben unter Aktenzeichen K(2002) 3044) (2002/657/EG).
- ANONYMOUS, 2006. Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln, ABl. Nr. L 364 S. 5, Celex-Nr. 3 2006 R 1881, Zuletzt geändert durch Art. 1 ÄndVO (EU) 1058/2012 vom 12. 11. 2012 (ABl. Nr. L 313 S. 14).
- ANONYMOUS, 2007. Verordnung (EG) Nr. 834/2007 des Rates vom 28. Juni 2007 über die ökologische/biologische Produktion und die Kennzeichnung von ökologischen/biologischen Erzeugnissen und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 2092/91, (ABl. Nr. L 189 S. 1), Celex-Nr. 3 2007 R 0834, Zuletzt geändert durch Art. 1 ÄndVO (EG) 967/2008 vom 29. 9. 2008 (ABl. Nr. L 264 S. 1).
- ANONYMOUS, 2010. Ubena Newsletter http://www.ubena-foodservice.de/pdf/-UBENA_NEWSLETTER_1.pdf. Zugriff am: 05.03.2013.

- ANONYMOUS, 2011a. Veröffentlichte mikrobiologische Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Lebensmitteln (Stand: November 2011). Eine Empfehlung der Fachgruppe Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM).
- ANONYMOUS, 2011b. Verordnung über die Behandlung von Lebensmitteln mit Elektronen-, Gamma- und Röntgenstrahlen, Neutronen oder ultravioletten Strahlen (Lebensmittelbestrahlungsverordnung -LMBestV) vom 14.12.2000, zuletzt geändert durch Art. 7 V v. 13.12.2011 I 272, Umsetzung der EGRL 2/99 (CELEX Nr: 399L0002), EGRL 3/99 (CELEX Nr: 399L0003), EGRL 13/2000 (CELEX Nr: 300L0013).
- ANONYMOUS, 2012. National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Zugriff am: 20.03.2013.
- ANONYMOUS, 2013a. Classification for Kingdom Plantae down to Family *Lamiaceae*. <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=Lamiaceae>. Zugriff am: 10.03.2013.
- ANONYMOUS, 2013b. EnviroLogix Inc., QuantiTox™ Trichothecenes Plate Kit - EP 100. http://www.envirologix.com/artman/publish/article_88.shtml. Zugriff am: 10.03.2013.
- ANONYMOUS, 2013c. Eurofins MWG Operon. <http://www.eurofinsgenomics.eu/en/eurofins-mwg-operon/product-faqs/custom-dna-sequencing.aspx>. Zugriff am: 10.03.2013.
- ANONYMOUS, 2013d. Fachverband der Gewürzindustrie e.V., Die Gewürze und ihre industrielle Veredelung. <http://www.gewuerzindustrie.de/index-gewuerzindustrie.html/kleine-gewuerzkunde/kleine-gewuerzkunde-die-gewuerze-und-ihre-industrielle-veredelung>. Zugriff am: 10.03.2013.
- ANONYMOUS, 2013e. Fachverband der Gewürzindustrie e.V., Presse und Statistik. <http://www.gewuerzindustrie.de/index-gewuerzindustrie.html/presse-statistik-gewuerze/marktentwicklung-der-gewuerzindustrie>. Zugriff am: 10.03.2013.
- ANONYMOUS, 2013f. Fuchsgruppe Firmenprospekt. http://fuchsspice.com/-42835/Fuchs-Gruppe_Firmenprospekt.pdf. Zugriff am: 15.01.2013.
- ANONYMOUS, 2013g. Index Fungorum. <http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=161114>. Zugriff am: 08.03.2013.
- BATA, A., HARRACH, B., UJSZÁSZI, K., KIS-TAMÁS, A., LÁSZTITY, R., 1985. Macrocyclic Trichothecene toxins produced by *Stachybotrys atra* strains isolated in Middle Europe. Applied and Environmental Microbiology 49, 678-681.
- BAXTER, R., HOLZAPFEL, W.H., 1982. A microbial investigation of selected spices, herbs and additives in South-Africa. Journal of Food Science 47, 570-574.

- BISBY, G.R., 1943. *Stachybotrys*. Transactions of the British Mycological Society 26, 133-143.
- BLACKWELL, M., HIBBETT, D.S., TAYLOR, J.W., SPATAFORA, J.W., 2006. Research coordination networks: a phylogeny for kingdom Fungi (Deep Hypha). Mycologia 98, 829-837.
- BLOOM, E., BAL, K., NYMAN, E., MUST, A., LARSSON, L., 2007. Mass Spectrometry-based strategy for direct detection and quantification of some mycotoxins produced by *Stachybotrys* and *Aspergillus* spp. in indoor environments. Applied and Environmental Microbiology 73, 4211-4217.
- BRASEL, T.L., MARTIN, J.M., CARRIKER, C.G., WILSON, S.C., STRAUS, D.C., 2005. Detection of airborne *Stachybotrys chartarum* macrocyclic trichothecene mycotoxins in the indoor environment. Applied and Environmental Microbiology 71, 7376-7388.
- CARMO, E.S., LIMA, E.D.O., SOUZA, E.L.D., 2008. The potential of *Origanum vulgare* L. (*Lamiaceae*) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. Brazilian Journal of Microbiology 39, 362-367.
- CASTLEBURY, L.A., ROSSMAN, A.Y., SUNG, G.-H., HYTEN, A.S., SPATAFORA, J.W., 2004. Multigene phylogeny reveals new lineage for *Stachybotrys chartarum*, the indoor air fungus. Mycological Research 108, 864-872.
- COLE, R.J., JARVIS, B.B., SCHWEIKERT, M.A., 2003. Handbook of secondary fungal metabolites, 3 Edition. Academic Press, London
- CORDA, A.C.J., 1837. Icones fungorum hucusque cognitorum. In: Cramer, J., Swann, H.K. (Hrsg.) Historiae Naturalis Classica (Reprint 1963). Wheldon & Wesley, LTD and Hafner Publishing Co. Codidote, Herts., New York.
- CRUSE, M., TELERANT, R., GALLAGHER, T., LEE, T., TAYLOR, J.W., 2002. Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. Mycologia 94, 814-822.
- DEARBORN, D.G., SMITH, P.G., DAHMS, B.B., ALLAN, T.M., SORENSON, W.G., MONTANA, E., ETZEL, R.A., 2002. Clinical profile of 30 infants with acute pulmonary hemorrhage in Cleveland. Pediatrics 110, 627-637.
- DEARBORN, D.G., YIKE, I., SORENSON, W.G., MILLER, M.J., ETZEL, R.A., 1999. Overview of investigations into pulmonary hemorrhage among infants in Cleveland, Ohio. Environmental Health Perspectives 107, 495-499.
- DOOHAN, F.M., WESTON, G., REZANOOR, H.N., PARRY, D.W., NICHOLSON, P., 1999. Development and use of a reverse transcription-PCR assay to study expression of Tri5 by *Fusarium* species in vitro and in planta. Applied and Environmental Microbiology 65, 3850-3854.
- DROBOTKO, V.G., 1945. Stachybotryotoxicosis. A new disease of horses and humans. Am. Rev. Soviet Med. 2, 238-242.

- ELSHAFIE, A., AL-RASHDI, T., AL-BAHRY, S.N., BAKHEIT, C., 2002. Fungi and aflatoxins associated with spices in the Sultanate of Oman. *Mycopathologia* 155, 155-160.
- ETZEL, R., MONTAÑA, E., SORENSON, W.G., KULLMAN, G.J., ALLAN, T.M., DEARBORN, D.G., 1998. Acute pulmonary hemorrhage in infants associated with exposure to *stachybotrys atra* and other fungi. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* 152, 757-762.
- FORGACS, J., CARLL, W.T., 1962. Mycotoxicosis. In: Brandly, C.A., Jungherr, E.L. (Hrsg.) *Advances in Veterinary Science*. Academic Press, New York and London, 273-382.
- FRAZER, S., MAGAN, N., ALDRED, D., 2011. The influence of water activity and temperature on germination, growth and sporulation of *Stachybotrys chartarum* strains. *Mycopathologia* 172, 17-23.
- GAREIS, M., 1994. Cytotoxicity testing of samples originating from problem buildings. In: *Fungi and Bacteria in Indoor Air Environments*, Saratoga Springs, New York, 139-144.
- GAREIS, M., 2006. Diagnostischer Zellkulturtest (MTT-Test) für den Nachweis von zytotoxischen Kontaminanten und Rückständen. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 1, 354-363.
- GAREIS, M., 2011. Persönliche Mitteilung.
- GAREIS, M., 2013. Persönliche Mitteilung.
- GEDEK, B., 1980. *Kompandium der medizinischen Mykologie*. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
- GENTILI, A., CARETTI, F., D'ASCENZO, G., MAINERO ROCCA, L., MARCHESE, S., MATERAZZI, S., PERRET, D., 2007. Simultaneous determination of trichothecenes A, B, and D in maize food products by LC-MS/MS. *Chromatographia* 66, 669-676.
- GERHARDT, U., 1994. *Gewürze in der Lebensmittelindustrie : Eigenschaften, Technologien, Verwendung*. Behr, Hamburg
- GOTTSCHALK, C., 2013. Persönliche Mitteilung.
- GOTTSCHALK, C., BARTHEL, J., ENGELHARDT, G., BAUER, J., MEYER, K., 2009. Simultaneous determination of type A, B and D trichothecenes and their occurrence in cereals and cereal products. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 26, 1273-1289.
- GOTTSCHALK, C., BAUER, J., MEYER, K., 2006. Determination of macrocyclic trichothecenes in mouldy indoor materials by LC-MS/MS. *Mycotoxin Research* 22, 189-192.

- GOTTSCHALK, C., BAUER, J., MEYER, K., 2008. Detection of Satratoxin G and H in indoor air from a water-damaged building. *Mycopathologia* 166, 103-107.
- GRAUBAUM, D., KLEER, J., HILDEBRANDT, G., 2005. Nachweis von Salmonellen in Gewürzen : Zur Notwendigkeit einer Voranreicherung im Verhältnis 1:100. Vol 85. Deutscher Fachverlag, Frankfurt am Main, ALLEMAGNE, 5.
- HAMMON, A., 2008. Untersuchungen zum Vorkommen und zur Toxizität von *Bacillus cereus* in Gewürzen. Ludwig-Maximilians-Universität.
- HANELT, M., GAREIS, M., KOLLARCZIK, B., 1994. Cytotoxicity of Mycotoxins Evaluated by the MTT-Cell Culture Assay. *Mycopathologia* 128, 167-174.
- HARRACH, B., BATA, A., BAJMÓCY, E., BENKO, M., 1983. Isolation of satratoxins from the bedding straw of a sheep flock with fatal stachybotryotoxicosis. *Applied and Environmental Microbiology* 45, 1419-1422.
- HARRACH, B., BATA, A., SÁNDOR, G., VÁNYI, A., 1987. Isolation of macrocyclic and non-macrocyclic trichothecenes (*stachybotrys* and *fusarium* toxins) from the Environment of 200 Ill Sport Horses. *Mycotoxin Research* 3, 65-68.
- HASHEM, M., ALAMRI, S., 2010. Contamination of common spices in Saudi Arabia markets with potential mycotoxin-producing fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences* 17, 167-175.
- HAUGLAND, R.A., HECKMAN, J.L., 1998. Identification of putative sequence specific PCR primers for detection of the toxigenic fungal species *Stachybotrys chartarum*. *Molecular and Cellular Probes* 12, 387-396.
- HAUGLAND, R.A., VESPER, S.J., HARMON, S.M., 2001. Phylogenetic relationships of *Memnoniella* and *Stachybotrys* species and evaluation of morphological features for *Memnoniella* species identification. *Mycologia* 93, 54-65.
- HIBBETT, D.S., BINDER, M., BISCHOFF, J.F., BLACKWELL, M., CANNON, P.F., ERIKSSON, O.E., HUHDORF, S., JAMES, T., KIRK, P.M., LÜCKING, R., THORSTEN LUMBSCH, H., LUTZONI, F., MATHENY, P.B., MCLAUGHLIN, D.J., POWELL, M.J., REDHEAD, S., SCHOCH, C.L., SPATAFORA, J.W., STALPERS, J.A., VILGALYS, R., AIME, M.C., APTROOT, A., BAUER, R., BEGEROW, D., BENNY, G.L., CASTLEBURY, L.A., CROUS, P.W., DAI, Y.-C., GAMS, W., GEISER, D.M., GRIFFITH, G.W., GUEIDAN, C., HAWKSWORTH, D.L., HESTMARK, G., HOSAKA, K., HUMBER, R.A., HYDE, K.D., IRONSIDE, J.E., KÖLJALG, U., KURTZMAN, C.P., LARSSON, K.-H., LICHTWARDT, R., LONGCORE, J., MIĄDLIKOWSKA, J., MILLER, A., MONCALVO, J.-M., MOZLEY-STANDRIDGE, S., OBERWINKLER, F., PARMASIO, E., REEB, V., ROGERS, J.D., ROUX, C., RYVARDEN, L., SAMPAIO, J.P., SCHÜßLER, A., SUGIYAMA, J., THORN, R.G., TIBELL, L., UNTEREINER, W.A., WALKER, C., WANG, Z., WEIR, A., WEISS, M., WHITE, M.M., WINKA, K., YAO, Y.-J., ZHANG, N., 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111, 509-547.

- HINKLEY, S.F., JIANG, J., MAZZOLA, E.P., JARVIS, B.B., 1999. Atranones: Novel diterpenoids from the toxigenic mold *Stachybotrys atra*. *Tetrahedron Letters* 40, 2725-2728.
- HINKLEY, S.F., MAZZOLA, E.P., FETTINGER, J.C., LAM, Y.-F., JARVIS, B.B., 2000. Atranones A–G, from the toxigenic mold *Stachybotrys chartarum*. *Phytochemistry* 55, 663-673.
- HINKLEY, S.F., MOORE, J.A., SQUILLARI, J., TAK, H., OLESZEWSKI, R., MAZZOLA, E.P., JARVIS, B.B., 2003. New atranones from the fungus *Stachybotrys chartarum*. *Magnetic Resonance in Chemistry* 41, 337-343.
- HINTIKKA, E.-L., 1977a. The Genus *Stachybotrys*. In: Wyllie, T.D., Morehouse, L.G. (Hrsg.) *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicosis. An Encyclopedia Handbook*. Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 91-98.
- HINTIKKA, E.-L., 1977b. *Stachybotryotoxicosis in Horses*. In: Wyllie, T.D., Morehouse, L.G. (Hrsg.) *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicosis. An Encyclopedia Handbook*. Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 181-185.
- HÖHNE, M., 2008. Untersuchungen zur Mykotoxinbildung durch *Stachybotrys chartarum* Chemotyp S. Diplomarbeit. Fachhochschule Jena.
- HUBER, I., 2012. Persönliche Mitteilung.
- JARMAI, K., 1929. Viskosusseptikaemien bei älteren Fohlen und erwachsenen Pferden. *Dt. Tierärztl. Wschr.* 33, 517-519.
- JARVIS, B.B., 2003. *Stachybotrys chartarum*: a fungus for our time. *Phytochemistry* 64, 53-60.
- JARVIS, B.B., CÄMEZOGLU, S.N., AMMON, H.L., BREEDLOVE, C.K., MILLER, R.W., WOODE, M.K., STREELMAN, D.R., SNEDEN, A.T., DAILEY, R.G., KUPCHAN, S.M., BRYAN, R., 1987. New macrocyclic trichothecenes from *Baccharis megapotamica*. *Journal of Natural Products* 50, 815-828.
- JARVIS, B.B., EPPLEY, R.M., MAZZOLA, E.P., 1983. Chemistry of trichothecenes - Chemistry and bioproduction of macrocyclic trichothecenes. In: Ueno, Y. (Hrsg.) *Trichothecenes - Chemical, Biological and Toxicological Aspects*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 20-38.
- JARVIS, B.B., MIDIWO, J.O., BEAN, G.A., ABOUL-NASR, M.B., BARNOS, C.S., 1988. The Mystery of trichothecene antibiotics in *Baccharis* species. *Journal of Natural Products* 51, 736-744.
- JARVIS, B.B., SALEMME, J., MORALS, A., 1995. *Stachybotrys* toxins. 1. Natural Toxins 3, 10-16.

- JARVIS, B.B., SORENSON, W.G., HINTIKKA, E.-L., NIKULIN, M., ZHOU, Y., JIANG, J., WANG, S., HINKLEY, S., ETZEL, R.A., DEARBORN, D., 1998. Study of toxin production by isolates of *Stachybotrys chartarum* and *Memnoniella echinata* isolated during a study of pulmonary hemosiderosis in infants. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3620-3625.
- JOHANNING, E., 1994. Health problems related to fungal exposure - the example of toxigenic *Stachybotrys chartarum*. In: *Fungi and Bacteria in Indoor Air Environments*, Saratoga Springs, New York, 169-182.
- JOHANNING, E., BIAGINI, R., HULL, D., MOREY, P., JARVIS, B., LANDSBERGIS, P., 1996. Health and immunology study following exposure to toxigenic fungi (*Stachybotrys chartarum*) in a water-damaged office environment. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 68, 207-218.
- JOLLÈS, P., 1999. Chitin and chitinases. Birkhäuser, Basel [u.a.]
- JONG, S.C., DAVIS, E.E., 1976. Contribution to the knowledge of *Stachybotrys* and *Memnoniella* in culture. *Mycotaxon* 3, 409-485.
- KLÖTZEL, M., GUTSCHE, B., LAUBER, U., HUMPF, H.-U., 2005. Determination of 12 type A and B trichothecenes in cereals by Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 8904-8910.
- KLUWE, H., 2006. Untersuchungen zum Vorkommen und zur Toxizität von *Stachybotrys* spp. in Heu- und Strohproben aus Pferdeställen. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- KNEIFEL, W., BERGER, E., 1994. Microbiological criteria of random samples of spices and herbs retailed on the Austrian market. *Journal of Food Protection* 57, 893-901.
- KUHN, D.M., GHANNOUM, M.A., 2003. Indoor mold, toxigenic fungi, and *Stachybotrys chartarum*: Infectious disease perspective. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 144-172.
- LANIER, C., ANDRE, V., SEGUIN, V., HEUTTE, N., EL KADDOUMI, A., BOUCHART, V., PICQUET, R., GARON, D., 2012. Recurrence of *Stachybotrys chartarum* during mycological and toxicological study of bioaerosols collected in a dairy cattle shed. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM* 19, 61-67.
- LITTLE, C.L., OMOTOYE, R., MITCHELL, R.T., 2003. The microbiological quality of ready-to-eat foods with added spices. *Int. J. Environ. Health Res.* 13, 31-42.
- LÖFFLER, G., 2007. Biochemie und Pathobiochemie Springer, Heidelberg
- LOTTSPREICH, F., ENGELS, J.W., SOLODKOFF, Z.L., 2012. Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, München

- MANDEEL, Q., 2005. Fungal contamination of some imported spices. *Mycopathologia* 159, 291-298.
- MÄRTLBAUER, E., GAREIS, M., TERPLAN, G., 1988. Enzyme immunoassay for the macrocyclic trichothecene roridin A: production, properties, and use of rabbit antibodies. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 225-230.
- MCCORMICK, S.P., STANLEY, A.M., STOVER, N.A., ALEXANDER, N.J., 2011. Trichothecenes: From simple to complex mycotoxins. *Toxins* 3, 802-814.
- MOROSHKIN, B.F., 1968. Stachybotryotoxicosis in horses. *Prob. Vet. Sanit. Trudy* 27, 124-131.
- MOSELIANI, D.V., 1940. *Stachybotrys* infection in horses. *Sovetskaya Veterinariya* 10, 42-44.
- NIELSEN, K., HUTTUNEN, K., HYVÄRINEN, A., ANDERSEN, B., JARVIS, B., HIRVONEN, M.-R., 2002. Metabolite profiles of *Stachybotrys* isolates from water-damaged buildings and their induction of inflammatory mediators and cytotoxicity in macrophages. *Mycopathologia* 154, 201-206.
- NIELSEN, K.F., 2003. Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genetics and Biology* 39, 103-117.
- NIELSEN, K.F., HANSEN, M.Ø., LARSEN, T.O., THRANE, U., 1998. Production of trichothecene mycotoxins on water damaged gypsum boards in Danish buildings. *International Biodeterioration & Biodegradation* 42, 1-7.
- NIELSEN, K.F., HOLM, G., UTTRUP, L.P., NIELSEN, P.A., 2004. Mould growth on building materials under low water activities. Influence of humidity and temperature on fungal growth and secondary metabolism. *International Biodeterioration & Biodegradation* 54, 325-336.
- NIETO-SANDOVAL, J.M., ALMELA, L., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A., MUÑOZ, J.A., 2000. Effect of electron beam irradiation on color and microbial bioburden of red paprika. *Journal of Food Protection* 63, 633-637.
- NIKULIN, M., PASANEN, A.-L., BERG, S., HINTIKKA, E.-L., 1994. *Stachybotrys atra* growth and toxin production in some building materials and fodder under different relative humidities. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 3421-3424.
- OHFF, R., WEISSBACH, F., 1984. Studies into *Stachybotrys-atra* - Detection and occurrence in feedstuffs in GDR. *Mon.heft. Vet.med.* 39, 628-631.
- PAEPENS, C., DE SAEGER, S., VAN POUCKE, C., DUMOULIN, F., VAN CALENBERGH, S., VAN PETEGHEM, C., 2005. Development of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantification of fumonisin B1, B2 and B3 in cornflakes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19, 2021-2029.

- PELTOLA, J., NIESSEN, L., NIELSEN, K.F., JARVIS, B.B., ANDERSEN, B., SALKINOJA-SALONEN, M., OUMI, L., 2002. Toxigenic diversity of two different RAPD groups of *Stachybotrys chartarum* isolates analyzed by potential for trichothecene production and for boar sperm cell motility inhibition. *Canadian Journal of Microbiology* 48, 1017-1029.
- PESTKA, J.J., LEE, S.C., LAU, H.P., CHU, F.S., 1981a. Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay for T-2 Toxin. *Journal of the American Oil Chemists Society* 58, A940-A944.
- PESTKA, J.J., STEINERT, B.W., CHU, F.S., 1981b. Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay for detection of Ochratoxin-A. *Applied and Environmental Microbiology* 41, 1472-1474.
- PESTKA, J.J., YIKE, I., DEARBORN, D.G., WARD, M.D.W., HARKEMA, J.R., 2008. *Stachybotrys chartarum*, trichothecene mycotoxins, and damp building-related illness: New insights into a public health enigma. *Toxicological Sciences* 104, 4-26.
- PIECKOVA, E., HURBANKOVA, M., CERNA, S., PIVOVAROVA, Z., KOVACIKOVA, Z., 2006. Pulmonary cytotoxicity of secondary metabolites of *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb.) Hughes. *Ann. Agr. Env. Med.* 13, 259-262.
- RAND, T.G., FLEMMING, J., DAVID MILLER, J., WOMILOJU, T.O., 2006. Comparison of inflammatory responses in mouse lungs exposed to atranones A and C from *Stachybotrys chartarum*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 69, 1239-1251.
- REUBEL, G., GAREIS, M., AMSELGRUBER, W., 1987. Cytotoxicity evaluation of mycotoxins by an MTT-bioassay. *Mycotoxin Research* 3, 85-96.
- REUBEL, G.H., GAREIS, M., AMSELGRUBER, W.M., 1989. Effects of the *Fusarium* mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on the mitochondrial methylthiazol tetrazolium-cleavage activity of monolayer cells. *Toxicology in Vitro* 3, 311-316.
- ROTHENEDER, R., 1996. Neue methodische Aspekte zur Selektion lebensmittelgeeigneter *Penicillium* spp. für die Rohwurstveredelung. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- RUNDBERGET, T., WILKINS, A.L., 2002. Determination of *Penicillium* mycotoxins in foods and feeds using liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 964, 189-197.
- RUOTSALAINEN, M., HIRVONEN, M.-R., HYVÄRINEN, A., TEIJA, M., SAVOLAINEN, K., NEVALAINEN, A., 1998. Cytotoxicity, production of reactive oxygen species and cytokines induced by different strains of *Stachybotrys* sp. from moldy buildings in RAW264.7 macrophages. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 6, 193-199.
- SALZER, U.-J., SIEWEK, F., 2012. Handbuch Aromen und Gewürze. Vol 1. Behr's Verlag, Hamburg

- SAMSON, R.A., 2010. Food and indoor fungi. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74, 5463-5467.
- SCHEEL, C.M., ROSING, W.C., FARONE, A.L., 2001. Possible sources of sick building syndrome in a Tennessee middle school. Archives of Environmental Health 56, 413-417.
- SCHWEIGGERT, U., CARLE, R., SCHIEBER, A., 2007. Conventional and alternative processes for spice production – a review. Trends Food Sci. Technol. 18, 260-268.
- SELKE, S.B.C., FLORIDA, U.O., 2007. Distribution and occurrence of *Stachybotrys chartarum* in North Central Florida habitats. University of Florida, Florida
- STACK, M.E., EPPLEY, R.M., 1980. High pressure liquid chromatographic determination of satratoxins G and H in cereal grains. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 63, 1278-1281.
- STECHER, G., JARUKAMJORN, K., ZABORSKI, P., BAKRY, R., HUCK, C.W., BONN, G.K., 2007. Evaluation of extraction methods for the simultaneous analysis of simple and macrocyclic trichothecenes. Talanta 73, 251-257.
- SULYOK, M., KRSKA, R., SCHUHMACHER, R., 2010. Application of an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds. Food Chemistry 119, 408-416.
- TERR, A.I., 2001. *Stachybotrys*: relevance to human disease. Annals of Allergy Asthma & Immunology 87, 57-63.
- THUVANDER, A., WIKMAN, C., GADHASSON, I., 1999. In vitro exposure of human lymphocytes to trichothecenes: Individual variation in sensitivity and effects of combined exposure on lymphocyte function. Food and Chemical Toxicology 37, 639-648.
- TUOMI, T., REIJULA, K., JOHANSSON, T., HEMMINKI, K., HINTIKKA, E.-L., LINDROOS, O., KALSO, S., KOUKILA-KÄHKÖLÄ, P., MUSSALO-RAUHAMAA, H., HAAHTELA, T., 2000. Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings. Applied and Environmental Microbiology 66, 1899-1904.
- UENO, Y., 1983. Trichothecenes - Chemical, biological and toxicological aspects. Elsevier, Amsterdam
- UENO, Y., 1984. Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes. Fundamental and Applied Toxicology 4, S124-S132.

- VAN WYK, B.E., 2005. Handbuch der Nahrungspflanzen: Ein illustrierter Leitfaden. Wiss. Verlag-Ges., Stuttgart
- VESPER, S.J., DEARBORN, D.G., ELIDEMIR, O., HAUGLAND, R.A., 2000. Quantification of siderophore and hemolysin from *Stachybotrys chartarum* strains, including a strain isolated from the lung of a child with pulmonary hemorrhage and hemosiderosis. Applied and Environmental Microbiology 66, 2678-2681.
- VESPER, S.J., DEARBORN, D.G., YIKE, I., SORENSON, W.G., HAUGLAND, R.A., 1999. Hemolysis, toxicity, and randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Stachybotrys chartarum* strains. Applied and Environmental Microbiology 65, 3175-3181.
- WEBER, H., 2003. Herbs - Technologies for safe products - Approaches to cleaning and decontaminating herbs (Part One). Fleischwirtschaft 83, 33-36.
- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M., Gelfand, D., Shinsky, J., White, T. (Hrsg.) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, 315-322.
- WOLOSHUK, C.P., SHIM, W.-B., 2013. Aflatoxins, fumonisins, and trichothecenes: a convergence of knowledge. FEMS Microbiology Reviews 37, 94-109.
- XAVIER, J.J.M., SCUSSEL, V.M., 2008. Development of an LC-MS/MS method for the determination of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in Brazil nut. International Journal of Environmental Analytical Chemistry 88, 425-433.
- YOSHIZAWA, T., OTSUBO, K., SASAKI, T., NAKAMURA, K., 1986. Acute toxicities of satratoxins G and H in mice. A histopathological observation with special reference to the liver injury caused by satratoxin G. Maikotokishin (Tokyo) 23, 53-57. Zitiert nach JARVIS, B.B. Macrocyclic Trichothecenes. In: SHARMA, R.P., SALUNKHE, D.K. 1991. Mycotoxins and Phytoalexins. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 1361-1421.
- ZÖLLNER, P., JODLBAUER, J., LINDNER, W., 1999. Determination of zearalenone in grains by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry after solid-phase extraction with RP-18 columns or immunoaffinity columns. Journal of Chromatography A 858, 167-174.

9 ANHANG

Tabelle 38: Bezeichnung und Hersteller der Kräuterproben (n = 80)

Probenbezeichnung				Hersteller	Erzeugungsweise
Majoran	Oregano	Thymian	Bohnenkraut		
BM21	BO1	BT1	BB1	Wagner	Ökologisch
BM22	BO2	BT2	BB2	Wagner	Ökologisch
BM23	BO3	BT3	BB3	Wagner	Ökologisch
BM24	BO4	BT4	BB4	Wagner	Ökologisch
BM25	BO5	BT5	BB5	Wagner	Ökologisch
BM26	BO6	BT6	BB6	Wagner	Ökologisch
BM27	BO7	BT7	BB7	Wagner	Ökologisch
BM28	BO8	BT8	BB8	Fuchs	Konventionell
BM29	BO9	BT9	BB9	Fuchs	Konventionell
BM30	BO10	BT10	BB10	Wagner	Konventionell
BM31	BO11	BT11	BB11	Wagner	Konventionell
BM32	BO12	BT12	BB12	Ostmann	Konventionell
BM33	BO13	BT13	BB13	Ostmann	Konventionell
BM34	BO14	BT14	BB14	Ostmann	Konventionell
BM35	BO15	BT15	BB15	Lebensbaum	Ökologisch
BM36	BO16	BT16	BB16	Gewürzmühle Brecht	Ökologisch
BM37	BO17	BT17	BB17	Kräuter-Reich	Ökologisch
BM38	BO18	BT18	BB18	H.E.S Gewürze	Konventionell
BM39	BO19	BT19	BB19	Henosa Asiatic	Konventionell
BM40	BO20	BT20	BB20	Raps GmbH	Konventionell

Tabelle 39: Bezeichnung und Hersteller der Majoranproben (orientierende Studie, n = 20)

Probenbezeichnung	Hersteller	Erzeugungsweise
BM1	Henosa Asiatic	Konventionell
BM2	Fuchs	Konventionell
BM3	Fuchs	Konventionell
BM4	Ostmann	Konventionell
BM5	Ostmann	Konventionell
BM6	BioBio	Ökologisch
BM7	Kania Spices	Konventionell
BM8	Kania Spices	Konventionell
BM9	Ostmann	Konventionell
BM10	Ostmann	Konventionell
BM11	Fuchs	Konventionell
BM12	Wagner	Ökologisch
BM13	Mawea	Konventionell
BM14	Wagner	Ökologisch
BM15	Wagner	Ökologisch
BM16	Wagner	Ökologisch
BM17	H.E.S Gewürze	Konventionell
BM18	Wagner	Konventionell
BM19	Wagner	Konventionell
BM20	Wagner	Ökologisch

Tabelle 40: Aus den Kräuterproben Majoran, Oregano, Thymian und Bohnenkraut (jeweils n = 20) isolierte mykogene Mikrobiota

Schimmelpilzgattungen	Anzahl positiver Majoranproben in %	Anzahl positiver Oreganoproben in %	Anzahl positiver Thymianproben in %	Anzahl positiver Bohnenkrautproben in %
<i>Absidia</i> spp.	0	0	0	10
<i>Acremonium</i> spp.	15	0	25	40
<i>Alternaria</i> spp.	60	15	30	5
<i>Arthrinium</i> spp.	25	20	25	15
<i>Aspergillus</i> spp.	90	75	95	80
<i>Aureobasidium</i> spp.	0	0	10	0
<i>Bipolaris</i> spp.	45	0	0	5
<i>Botrytis</i> spp.	0	0	5	0
<i>Cercospora</i> spp.	0	5	0	0
<i>Chaetomium</i> spp.	60	15	40	40
<i>Chrysonilia</i> spp.	0	0	5	0
<i>Cladosporium</i> spp.	55	5	25	15
<i>Cunninghamella</i> spp.	5	0	0	0
<i>Drechslera</i> spp.	45	0	0	20
<i>Echinobotryum</i> spp.	5	0	5	0
<i>Emericella</i> spp.	35	5	5	5
<i>Epicoccum</i> spp.	30	5	0	5
<i>Eurotium</i> spp.	55	80	65	75
<i>Fusarium</i> spp.	10	0	15	10
<i>Geotrichum</i> spp.	0	0	5	0
<i>Gliocladium</i> spp.	0	0	0	10
<i>Graphium</i> spp.	0	0	0	5
Hefen	70	55	40	30
<i>Microascus</i> spp.	5	5	25	35
<i>Moniliella</i> spp.	5	0	5	0
<i>Mucor</i> spp.	20	15	25	30
<i>Myrothecium</i> spp.	5	0	0	0
<i>Myxotrichum</i> spp.	0	0	5	0
<i>Neosartoria</i> spp.	0	0	5	0
<i>Nigrospora</i> spp.	10	5	0	0
<i>Oidiodendron</i> spp.	5	30	10	20
<i>Ophiostoma</i> spp.	0	0	5	0
<i>Paecilomyces</i> spp.	5	20	5	5

Tabelle 40 (Fortsetzung): Aus den Kräuterproben Majoran, Oregano, Thymian und Bohnenkraut (jeweils n = 20) isolierte mykogene Mikrobiota

Schimmelpilzgattungen	Anzahl positiver Majoran-proben in %	Anzahl positiver Oregano-proben in %	Anzahl positiver Thymian-proben in %	Anzahl positiver Bohnenkraut-proben in %
<i>Penicillium</i> spp.	50	90	80	30
<i>Periconia</i> spp.	5	5	5	5
<i>Phialophora</i> spp.	0	0	0	5
<i>Phoma</i> spp.	45	30	60	45
<i>Podospora</i> spp.	0	0	15	20
<i>Pyrenochaeta</i> spp.	20	10	20	5
<i>Rhizopus</i> spp.	55	60	60	60
<i>Scedosporium</i> spp.	0	5	10	5
<i>Scopulariopsis</i> spp.	0	5	25	25
<i>Scytalidium</i> spp.	5	0	0	5
<i>Sepedonium</i> spp.	0	0	10	10
<i>Stachybotrys</i> spp.	20	20	15	15
<i>Stemphylium</i> spp.	25	20	10	5
<i>Streptomyces</i> spp.	55	50	65	50
<i>Syncephalastrum</i> spp.	5	0	5	0
<i>Talaromyces</i> spp.	0	0	10	0
<i>Thamnidium</i> spp.	5	0	0	0
<i>Torula</i> spp.	0	0	15	0
<i>Trichoderma</i> spp.	5	5	10	5
<i>Trichocladium</i> spp.	5	0	0	0
<i>Verticillium</i> spp.	0	0	20	0
<i>Wallemia</i> spp.	0	0	0	5

Tabelle 41: Aus den Kräuterproben Majoran, Oregano, Thymian und Bohnenkraut (jeweils n = 20) auf MEA⁺/DG-18 isolierte mykogene Mikrobiota

Schimmelpilzgattungen	Anzahl positiver Majoranproben in %	Anzahl positiver Oreganoproben in %	Anzahl positiver Thymianproben in %	Anzahl positiver Bohnenkrautproben in %
<i>Acremonium</i> spp.	10	5	0	10
<i>Alternaria</i> spp.	20	5	20	0
<i>Arthrimum</i> spp.	10	10	20	10
<i>Aspergillus</i> spp.	75	75	85	70
<i>Aureobasidium</i> spp.	0	0	10	0
<i>Botrytis</i> spp.	0	0	5	0
<i>Chaetomium</i> spp.	5	15	25	30
<i>Cladosporium</i> spp.	45	5	25	10
<i>Drechslera</i> spp.	0	0	0	20
<i>Epicoccum</i> spp.	15	5	0	0
<i>Eurotium</i> spp.	50	80	65	80
<i>Fusarium</i> spp.	10	0	15	5
<i>Geotrichum</i> spp.	0	0	5	0
Hefen	70	55	40	30
<i>Microascus</i> spp.	5	0	5	0
<i>Moniliella</i> spp.	5	0	5	0
<i>Mucor</i> spp.	20	15	25	20
<i>Myrothecium</i> spp.	5	0	0	0
<i>Nigrospora</i> spp.	5	0	0	0
<i>Oidiodendron</i> spp.	0	0	5	0
<i>Paecilomyces</i> spp.	5	15	5	0
<i>Penicillium</i> spp.	45	70	70	30
<i>Phialophora</i> spp.	5	0	0	0
<i>Phoma</i> spp.	20	30	45	45
<i>Podospora</i> spp.	0	0	5	0
<i>Pyrenochaeta</i> spp.	0	0	15	5
<i>Rhizopus</i> spp.	60	70	50	50
<i>Scedosporium</i> spp.	0	5	10	5
<i>Scopulariopsis</i> spp.	0	5	15	15
<i>Sepedonium</i> spp.	0	0	5	0
<i>Stachybotrys</i> spp.	5	10	5	0
<i>Stemphylium</i> spp.	5	15	10	5
<i>Syncephalastrum</i> spp.	5	0	5	0
<i>Talaromyces</i> spp.	0	0	10	0
<i>Thamnidium</i> spp.	5	0	0	0
<i>Trichoderma</i> spp.	0	5	10	5
<i>Ulocladium</i> spp.	20	30	25	25
<i>Verticillium</i> spp.	0	0	5	0
<i>Wallemia</i> spp.	0	0	0	5

Tabelle 42: Aus den Kräuterproben Majoran, Oregano, Thymian und Bohnenkraut (jeweils n = 20) auf IT isolierte mykogene Mikrobiota

Schimmelpilz- gattungen	Anzahl positiver Majoran- proben in %	Anzahl positiver Oregano- proben in %	Anzahl positiver Thymian- proben in %	Anzahl positiver Bohnenkraut- proben in %
<i>Acremonium</i> spp.	5	0	15	10
<i>Alternaria</i> spp.	35	5	20	5
<i>Arthrinium</i> spp.	10	10	5	0
<i>Aspergillus</i> sp.	75	70	45	45
<i>Bipolaris</i> spp.	25	0	0	5
<i>Botrytis</i> spp.	0	5	0	0
<i>Cercospora</i> spp.	0	5	0	0
<i>Chaetomium</i> spp.	45	5	20	20
<i>Chrysonilia</i> spp.	0	0	5	0
<i>Cladosporium</i> spp.	15	0	0	0
<i>Cunninghamella</i> spp.	5	0	0	0
<i>Drechslera</i> spp.	30	0	0	0
<i>Echinobotryum</i> spp.	5	0	5	0
<i>Emericella</i> spp.	25	5	5	5
<i>Epicoccum</i> spp.	5	0	0	0
<i>Eurotium</i> spp.	30	15	0	10
<i>Fusarium</i> spp.	10	0	0	5
<i>Gliocladium</i> spp.	0	0	0	5
<i>Graphium</i> spp.	0	0	0	5
<i>Microascus</i> spp.	5	0	20	25
<i>Myxotrichum</i> spp.	0	0	5	0
<i>Neosartoria</i> spp.	0	0	5	0
<i>Nigrospora</i> spp.	0	5	0	0
<i>Oidiodendron</i> spp.	0	30	5	10
<i>Ophiostoma</i> spp.	0	0	5	0
<i>Paecilomyces</i> spp.	0	5	0	0
<i>Penicillium</i> spp.	35	35	30	5
<i>Periconia</i> spp.	5	0	0	0
<i>Phialophora</i> spp.	0	0	0	5
<i>Phoma</i> spp.	30	10	35	5
<i>Podospora</i> spp.	0	0	15	20
<i>Pyrenochaeta</i> spp.	5	5	15	0
<i>Rhizopus</i> spp.	20	5	10	10
<i>Scopulariopsis</i> spp.	0	0	5	10
<i>Scytalidium</i> spp.	5	0	0	0
<i>Sepedonium</i> spp.	0	0	10	0
<i>Stachybotrys</i> spp.	20	10	10	15

Tabelle 42 (Fortsetzung): Aus den Kräuterproben Majoran, Oregano, Thymian und Bohnenkraut (jeweils n = 20) auf IT isolierte mykogene Mikrobiota

Schimmelpilz-gattungen	Anzahl positiver Majoran-proben in %	Anzahl positiver Oregano-proben in %	Anzahl positiver Thymian-proben in %	Anzahl positiver Bohnenkraut-proben in %
<i>Stemphylium</i> spp.	20	5	0	0
<i>Streptomyces</i> spp.	40	40	45	45
<i>Torula</i> spp.	0	0	5	0
<i>Trichocladium</i> spp.	5	0	0	0
<i>Ulocladium</i> spp.	15	15	5	0
<i>Verticillium</i> spp.	0	0	5	0

Tabelle 43: Aus den Kräuterproben Majoran, Oregano, Thymian und Bohnenkraut (jeweils n = 20) auf OF isolierte mykogene Mikrobiota

Schimmelpilz-gattungen	Anzahl positiver Majoran-proben in %	Anzahl positiver Oregano-proben in %	Anzahl positiver Thymian-proben in %	Anzahl positiver Bohnenkraut-proben in %
<i>Absidia</i> spp.	0	0	0	10
<i>Acremonium</i> spp.	5	0	20	25
<i>Alternaria</i> spp.	35	15	20	0
<i>Arthrimum</i> spp.	10	10	0	10
<i>Aspergillus</i> spp.	75	70	55	35
<i>Bipolaris</i> spp.	30	0	0	5
<i>Cercospora</i> spp.	0	5	0	0
<i>Chaetomium</i> spp.	40	5	10	15
<i>Cladosporium</i> spp.	10	0	0	5
<i>Cunninghamella</i> spp.	5	0	0	0
<i>Drechslera</i> spp.	25	0	0	0
<i>Emericella</i> spp.	30	0	0	5
<i>Epicoccum</i> spp.	15	0	0	5
<i>Eurotium</i> spp.	25	10	5	5
<i>Fusarium</i> spp.	5	0	0	5
<i>Gliocladium</i> spp.	0	0	0	10
<i>Microascus</i> spp.	0	5	25	20
<i>Moniliella</i> spp.	5	0	0	0
<i>Mucor</i> spp.	5	0	0	0
<i>Nigrospora</i> spp.	10	0	0	0
<i>Oidiodendron</i> spp.	5	0	10	20

Tabelle 43 (Fortsetzung): Aus den Kräuterproben Majoran, Oregano, Thymian und Bohnenkraut (jeweils n = 20) auf OF isolierte mykogene Mikrobiota

Schimmelpilz- gattungen	Anzahl positiver Majoran- proben in %	Anzahl positiver Oregano- proben in %	Anzahl positiver Thymian- proben in %	Anzahl positiver Bohnenkraut- proben in %
<i>Ophiostoma</i> spp.	0	0	5	0
<i>Paecilomyces</i> spp.	0	0	0	5
<i>Penicillium</i> spp.	25	60	55	10
<i>Periconia</i> spp.	0	5	5	5
<i>Phoma</i> spp.	30	10	40	20
<i>Podospora</i> spp.	0	0	5	15
<i>Pyrenochaeta</i> spp.	20	10	10	0
<i>Rhizopus</i> spp.	30	15	10	10
<i>Scopulariopsis</i> spp.	0	0	5	5
<i>Scytalidium</i> spp.	5	0	0	5
<i>Sepedonium</i> spp.	0	0	10	10
<i>Stachybotrys</i> spp.	15	5	5	5
<i>Stemphylium</i> spp.	20	15	0	0
<i>Streptomyces</i> spp.	50	35	60	40
<i>Sycephalastrum</i> spp.	10	0	0	0
<i>Torula</i> spp.	0	0	15	0
<i>Trichoderma</i> spp.	0	0	0	5
<i>Ulocladium</i> spp.	25	10	0	0
<i>Verticillium</i> spp.	0	0	15	0

Tabelle 44: Isolierte Schimmelpilzgattungen für ökologisch und konventionell erzeugte Kräuter sowie Anzahl der positiven Proben für die einzelnen Gattungen

Schimmelpilz- gattungen aus ökologisch erzeugten Kräutern	Anzahl positiver Proben (n = 40)	Anzahl positiver Proben in %	Schimmelpilz- gattungen aus konventionell erzeugten Kräutern	Anzahl positiver Proben (n = 40)	Anzahl positiver Proben in %
<i>Absidia</i> spp.	1	3	<i>Absidia</i> spp.	1	3
<i>Acremonium</i> spp.	8	20	<i>Acremonium</i> spp.	11	28
<i>Alternaria</i> spp.	10	25	<i>Alternaria</i> spp.	12	30
<i>Arthrinium</i> spp.	9	23	<i>Arthrinium</i> spp.	8	20
<i>Aspergillus</i> spp.	32	80	<i>Aspergillus</i> spp.	36	90
<i>Aureobasidium</i> spp.	2	5			
<i>Bipolaris</i> spp.	3	8	<i>Bipolaris</i> spp.	7	18
<i>Botrytis</i> spp.	1	3	<i>Botrytis</i> spp.	1	3
			<i>Cercospora</i> spp.	1	3
<i>Chaetomium</i> spp.	15	38	<i>Chaetomium</i> spp.	18	45
			<i>Chrysonilia</i> spp.	1	3
<i>Cladosporium</i> spp.	13	33	<i>Cladosporium</i> spp.	7	18
			<i>Cunninghamella</i> spp.	1	3
<i>Drechslera</i> spp.	3	8	<i>Drechslera</i> spp.	7	18
			<i>Echinobotryum</i> spp.	2	5
<i>Emericella</i> spp.	5	13	<i>Emericella</i> spp.	5	13
<i>Epicoccum</i> spp.	4	10	<i>Epicoccum</i> spp.	4	10
<i>Eurotium</i> spp.	30	75	<i>Eurotium</i> spp.	29	73
<i>Fusarium</i> spp.	3	8	<i>Fusarium</i> spp.	7	18
<i>Geotrichum</i> spp.	1	3			
<i>Graphium</i> spp.	1	3			
			<i>Gliocladium</i> spp.	2	5
Hefen	21	53	Hefen	19	48
<i>Microascus</i> spp.	6	15	<i>Microascus</i> spp.	8	20
<i>Moniliella</i> spp.	2	5	<i>Moniliella</i> spp.	1	3
<i>Mucor</i> spp.	10	25	<i>Mucor</i> spp.	9	23
<i>Myrothecium</i> spp.	1	3			
<i>Myxotrichum</i> spp.	1	3			
<i>Neosartoria</i> spp.	1	3			
<i>Nigrospora</i> spp.	3	8	<i>Nigrospora</i> spp.	1	3
<i>Oidiodendron</i> spp.	11	28	<i>Oidiodendron</i> spp.	3	8
<i>Ophiostoma</i> spp.	1	3			
<i>Paecilomyces</i> spp.	5	13	<i>Paecilomyces</i> spp.	2	5
<i>Penicillium</i> spp.	25	63	<i>Penicillium</i> spp.	27	68
<i>Periconia</i> spp.	2	5	<i>Periconia</i> spp.	2	5

Tabelle 44 (Fortsetzung): Isolierte Schimmelpilzgattungen für ökologisch und konventionell erzeugte Kräuter sowie Anzahl der positiven Proben für die einzelnen Gattungen

Schimmelpilz- gattungen aus ökologisch erzeugten Kräutern	Anzahl positiver Proben (n = 40)	Anzahl positiver Proben in %	Schimmelpilz- gattungen aus konventionell erzeugten Kräutern	Anzahl positiver Proben (n = 40)	Anzahl positiver Proben in %
<i>Phialophora</i> spp.	2	5			
<i>Phoma</i> spp.	16	40	<i>Phoma</i> spp.	21	53
<i>Podospora</i> spp.	1	2,5	<i>Podospora</i> spp.	7	18
<i>Pyrenochaeta</i> spp.	6	15	<i>Pyrenochaeta</i> spp.	5	13
<i>Rhizopus</i> spp.	25	63	<i>Rhizopus</i> spp.	27	68
<i>Scedosporium</i> spp.	3	7,5	<i>Scedosporium</i> spp.	1	3
<i>Scopulariopsis</i> spp.	4	10	<i>Scopulariopsis</i> spp.	8	20
<i>Scytalidium</i> spp.	1	3	<i>Scytalidium</i> spp.	1	3
			<i>Sepedonium</i> spp.	4	10
<i>Stachybotrys</i> spp.	9	23	<i>Stachybotrys</i> spp.	6	15
<i>Stemphylium</i> spp.	5	13	<i>Stemphylium</i> spp.	8	20
<i>Streptomyces</i> spp.	21	53	<i>Streptomyces</i> spp.	24	60
<i>Syncephalastrum</i> spp.	1	3	<i>Syncephalastrum</i> spp.	2	5
<i>Talaromyces</i> spp.	2	5			
<i>Thamnidium</i> spp.	1	3			
<i>Torula</i> spp.	3	8			
<i>Trichocladium</i> spp.	1	3			
<i>Trichoderma</i> spp.	2	5	<i>Trichoderma</i> spp.	3	8
<i>Ulocladium</i> spp.	11	28	<i>Ulocladium</i> spp.	14	35
<i>Verticillium</i> spp.	3	8	<i>Verticillium</i> spp.	2	5
			<i>Wallemia</i> spp.	1	3

Tabelle 45: Übersicht über die mykogenen Gesamtkeimzahlen (in KbE/g) der untersuchten Kräuterproben aus konventioneller bzw. ökologischer Erzeugung

Majoran (n = 20)		Oregano (n = 20)		Thymian (n = 20)		Bohnenkraut (n=20)	
Konventionell (n = 10)	Ökologisch (n = 10)	Konventionell (n = 10)	Ökologisch (n = 10)	Konventionell (n = 10)	Ökologisch (n = 10)	Konventionell (n = 10)	Ökologisch (n = 10)
$1,7 \times 10^4$	$2,1 \times 10^2$	$2,2 \times 10^3$	$1,0 \times 10^1$	n.n	$2,0 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	n.n
$1,2 \times 10^4$	$>10^5$	$6,5 \times 10^4$	n.n	n.n	n.n	$1,2 \times 10^2$	n.n
$7,8 \times 10^3$	n.n	$1,4 \times 10^3$	$8,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^1$	$4,7 \times 10^4$	$5,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$
$1,4 \times 10^4$	n.n	$2,0 \times 10^3$	n.n	n.n	$1,4 \times 10^5$	n.n	$1,6 \times 10^5$
$1,8 \times 10^4$	$1,6 \times 10^3$	$1,6 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^1$	$9,7 \times 10^2$	n.n	$3,0 \times 10^1$
$1,7 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$3,7 \times 10^3$	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$	$1,3 \times 10^4$	$3,5 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$
$1,4 \times 10^4$	$3,5 \times 10^2$	$2,2 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^1$	$1,1 \times 10^5$	$4,6 \times 10^2$	$2,0 \times 10^1$
$6,8 \times 10^4$	$6,0 \times 10^3$	$1,7 \times 10^5$	$1,2 \times 10^4$	$6,6 \times 10^4$	$1,3 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$	$2,8 \times 10^3$
$1,7 \times 10^4$	n.n	$2,1 \times 10^3$	n.n	$1,4 \times 10^2$	$1,9 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$
$9,4 \times 10^4$	n.n	$3,7 \times 10^2$	$5,2 \times 10^4$	$7,0 \times 10^3$	$9,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2$	$3,4 \times 10^2$

n.n: nicht nachweisbar, KbE/g: Koloniebildende Einheiten pro Gramm

Tabelle 46: Ergebnisse der MTT-Zellkulturtests der *Stachybotrys*-Isolate aus den Kräutern (n = 50)

Isolat	Gewürzart	Extrakt (15 g/ml) toxisch bis Verdünnungsstufe	IC ₅₀ -Wert (g/ml)
SBM1	Majoran	<1	>7,50 g/ml
SBM2	Majoran	1	7,50 g/ml
SBM3	Majoran	1	7,50 g/ml
SBM4	Majoran	1	7,50 g/ml
SBM5	Majoran	1	7,50 g/ml
SBM6	Majoran	1	7,50 g/ml
SBM7	Majoran	1	7,50 g/ml
SBM8	Majoran	2	3,75 g/ml
SBM9a	Majoran	1	7,50 g/ml
SBM9b	Majoran	2	3,75 g/ml
SBM10	Majoran	1	7,50 g/ml
SBM11	Majoran	2	3,75 g/ml
SBM12a	Majoran	2	3,75 g/ml
SBM12b	Majoran	1	7,50 g/ml
SBM13	Majoran	3	1,88 g/ml
SBM14a	Majoran	2	3,75 g/ml
SBM14b	Majoran	1	7,50 g/ml
SBM15	Majoran	1	7,50 g/ml
SBM16	Majoran	1	7,50 g/ml
SBM17a	Majoran	2	3,75 g/ml
SBM17b	Majoran	1	7,50 g/ml
SBM17c	Majoran	1	7,50 g/ml
SBM18	Majoran	2	3,75 g/ml
SBM19	Majoran	2	3,75 g/ml
SBM20	Majoran	2	3,75 g/ml
SBM21	Majoran	1	7,50 g/ml
SBM22	Majoran	1	7,50 g/ml
SBM23	Majoran	1	7,50 g/ml
SBM24	Majoran	1	7,50 g/ml
SBM25	Majoran	2	3,75 g/ml
SBM26	Majoran	1	7,50 g/ml
SBM27	Majoran	2	3,75 g/ml
SBM28	Majoran	4	0,94 g/ml
SBM29	Majoran	5	0,47 g/ml
SBM30	Majoran	3	1,88 g/ml
SBO1a	Oregano	6	0,23 g/ml
SBO1b	Oregano	6	0,23 g/ml
SBO2	Oregano	7	0,12 g/ml
SBO3	Oregano	3	1,88 g/ml

Tabelle 46 (Fortsetzung): Ergebnisse der MTT-Zellkulturtests der *Stachybotrys*-Isolate aus den Kräutern (n = 50)

Isolat	Gewürzart	Extrakt (15 g/ml) toxisch bis Verdünnungsstufe	IC ₅₀ -Wert (g/ml)
SBO4	Oregano	1	7,50 g/ml
SBT1	Thymian	1	7,50 g/ml
SBT1b	Thymian	1	7,50 g/ml
SBT2	Thymian	2	3,75 g/ml
SBT3	Thymian	10	0,03 g/ml
SBT4	Thymian	<1	>7,50 g/ml
SBB1	Bohnenkraut	1	7,50 g/ml
SBB2	Bohnenkraut	8	0,12 g/ml
SBB3	Bohnenkraut	<1	>7,50 g/ml
SBB4	Bohnenkraut	<1	>7,50 g/ml
SBB5	Bohnenkraut	1	7,50 g/ml

Tabelle 47: Ergebnisse der ELISA-Untersuchung der *Stachybotrys*-Isolate aus den Kräutern (n = 50) und der Referenzstämme

Isolat	Roridin A-Äquivalent in ng/g bei Verdünnungsstufe			
	1:2	1:50	1:500	1:5000
S7	0,51	<0,20	-	-
S1091	9,03	<0,20	-	-
S1114	>18,00	335,41	-	-
IBT40285	0,263	<0,20	-	-
IBT40293	>18,00	154,38	-	-
IBT40288	0,46	<0,20	-	-
SBM1	1,37	<0,20	-	-
SBM2	0,60	<0,20	-	-
SBM3	1,05	<0,20	-	-
SBM4	0,66	<0,20	-	-
SBM5	1,74	15,33	-	-
SBM6	1,18	<0,20	-	-
SBM7	1,12	<0,20	-	-
SBM8	1,33	<0,20	-	-
SBM9a	1,13	<0,20	-	-
SBM9b	0,44	<0,20	-	-
SBM10	0,59	<0,20	-	-
SBM11	0,76	<0,20	-	-
SBM12a	0,76	<0,20	-	-
SBM12b	0,47	n.a.	-	-
SBM13	0,77	<0,20	<0,20	<0,20
SBM14a	0,90	<0,20	-	-
SBM14b	0,72	<0,20	-	-
SBM15	0,22	<0,20	-	-
SBM16	0,95	n.a.	-	-
SBM17a	0,50	<0,20	-	-
SBM17b	0,27	<0,20	-	-
SBM17c	0,59	10,22	-	-
SBM18	0,39	<0,20	-	-
SBM19	0,35	<0,20	-	-
SBM20	0,95	<0,20	-	-
SBM21	0,33	<0,20	-	-
SBM22	0,71	-	-	-
SBM23	0,41	<0,20	-	-
SBM24	28,36	<0,20	-	-
SBM25	0,25	<0,20	<0,20	-
SBM26	0,91	<0,20	-	-
SBM27	0,46	<0,20	-	-
SBM28	0,35	<0,20	-	-

<0,2: Messwert lag unter dem niedrigsten Standardwert

>18,0: Messwert lag über dem höchsten Standardwert

-: nicht gemessen

Tabelle 47 (Fortsetzung): Ergebnisse der ELISA-Untersuchung der *Stachybotrys*-Isolate aus den Kräutern (n = 50) und der Referenzstämme

Isolat	Roridin A-Äquivalent in ng/g bei Verdünnungsstufe			
	1:2	1:50	1:500	1:5000
SBM29	0,46	<0,20	-	-
SBM30	11,30	<0,20	-	-
SBO1a	-	>18,00	2299,44	1991,22
SBO1b	-	>18,00	6141,91	19084,25
SBO2*	>18,00	>18,00	>18,00	<0,20
SBO3	0,97	<0,20	<0,20	<0,20
SBO4	<0,20	13,27	-	-
SBT1	0,25	<0,20	-	-
SBT1b	0,58	<0,20	-	-
SBT2	0,35	<0,20	<0,20	-
SBT3	-	>18,0	3444,32	5840,63
SBT4	0,42	<0,20	-	-
SBB1	0,44	<0,20	-	-
SBB2	-	>18,0	>18,00	1082,64
SBB3	0,39	<0,20	-	-
SBB4	0,44	<0,20	-	-
SBB5	0,36	<0,20	-	-

<0,2: Messwert lag unter dem niedrigsten Standardwert

>18,0: Messwert lag über dem höchsten Standardwert

-: nicht gemessen

*Die Ergebnisse der zusätzlichen Verdünnungsstufen für SBO2 lauten 2766,88 ng/g (1:1000), 2291,77 ng/g (1:2000) und 1784,37 ng/g (1:3500).

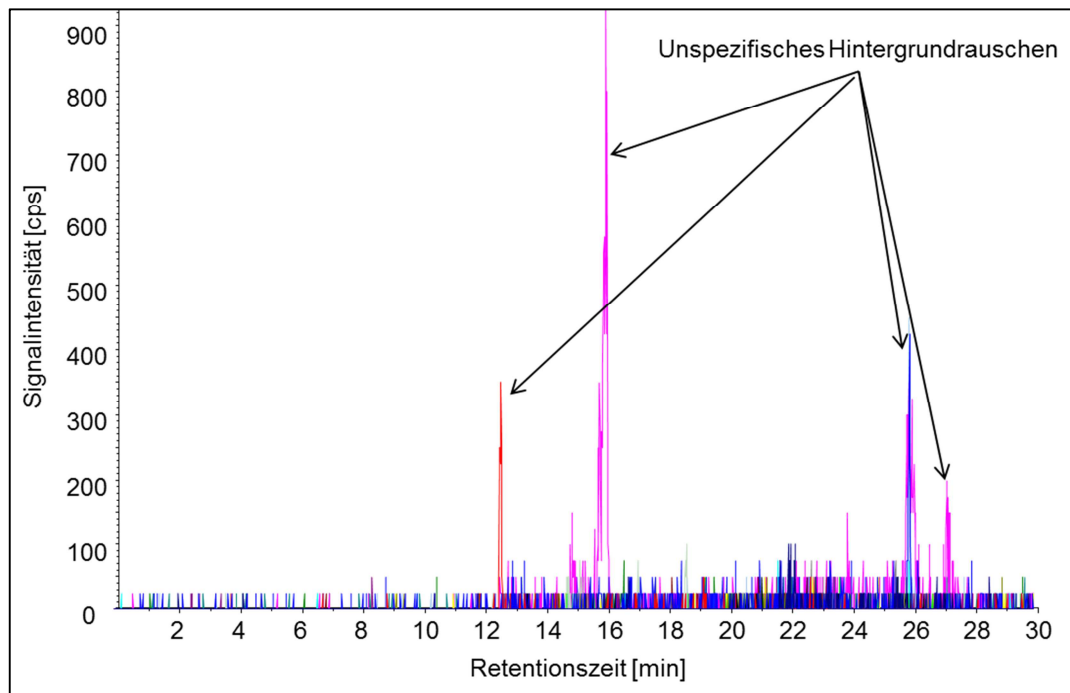


Abbildung 39: LC-MS/MS-Chromatogramm des Referenzstamms IBT40285 (*S. chlorohalonata*)

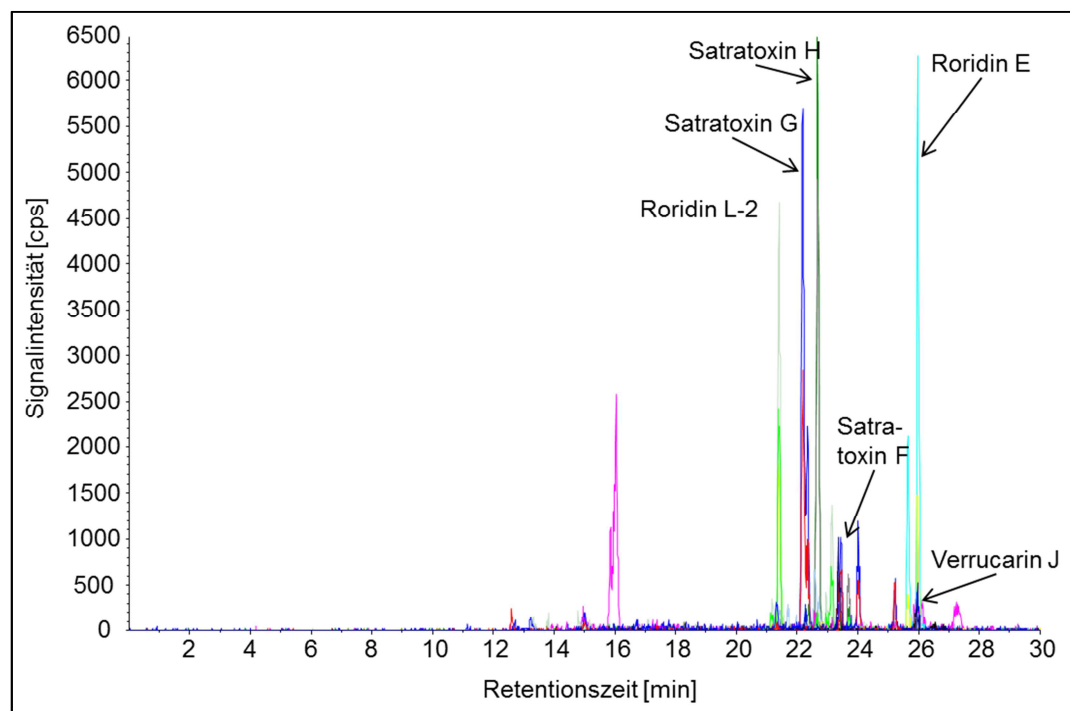


Abbildung 40: LC-MS/MS-Chromatogramm des Referenzstamms IBT40293 (*S. chartarum* Chemotyp S)

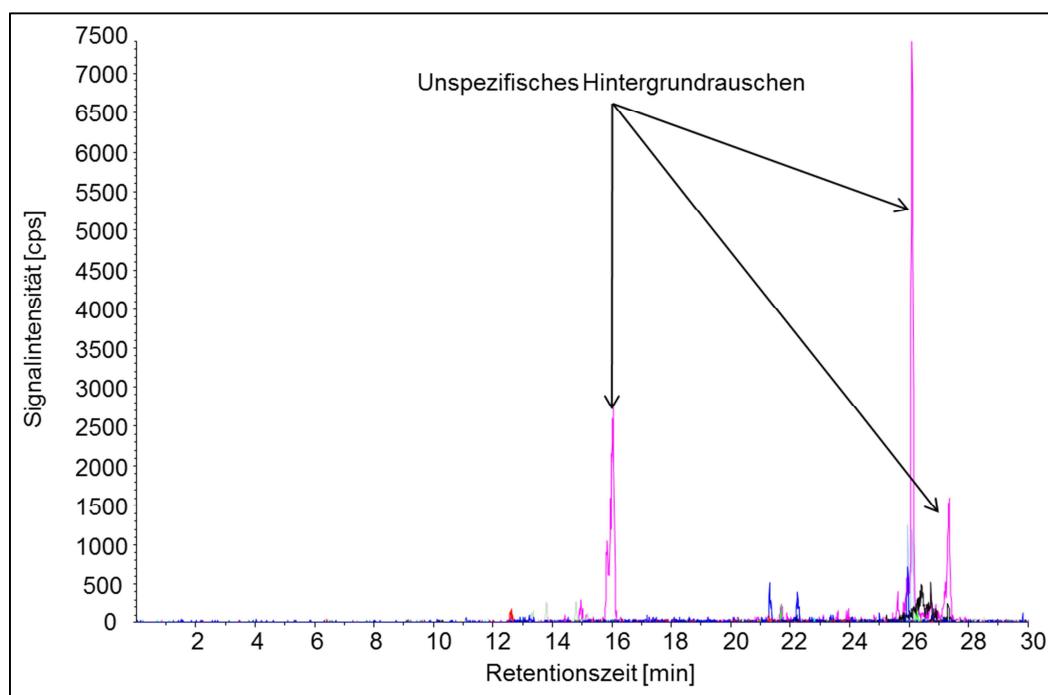


Abbildung 41: LC-MS/MS-Chromatogramm des Referenzstamms IBT40288 (*S. chartarum* Chemotyp A)

10 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. habil. M. Gareis, Inhaber des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit des Veterinärwissenschaftlichen Departments der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Überlassung des Themas, das Interesse an der Arbeit sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen. Die experimentellen Arbeiten wurden am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie des Max-Rubner-Institutes, Kulmbach, unter der damaligen Leitung von Prof. Dr. Dr. habil. M. Gareis durchgeführt.

Ganz herzlich danke ich der Brigitte und Wolfram Gedek-Stiftung für Mykotoxinforschung für die Bereitstellung eines Stipendiums, das sehr hilfreich bei der Anfertigung der Arbeit war.

Weiterhin gilt mein Dank den Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und Biotechnologie im Max Rubner-Institut, Standort Kulmbach für das gute Arbeitsklima und die schöne gemeinsame Zeit. Besonders danke ich Frau Petra Peetz für die großartige Unterstützung im Umgang mit meinen Schimmelpilzen und die vielen lehrreichen und amüsanten Stunden am Mikroskop, Frau Gina Krappmann für ihre fachliche Unterstützung und ihre Freundschaft und Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen, Frau Renate Schneider für die Durchführung der Zellkulturtests und Frau Helga Loske für die Unterstützung in der Molekularbiologie.

Den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit danke ich für die herzliche Aufnahme ins Team. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Silke Wacheck und Herrn Dr. Christoph Gottschalk für die geduldigen Korrekturen und die allzeit gewährte fachliche und seelisch-moralische Unterstützung. Danke für Eure Freundschaft und Euren unermüdlichen Einsatz, mich immer wieder zu motivieren, wenn ich mal nicht mehr weiter wusste. Eva-Maria Gareis und Nathalie Drees danke ich für die geduldige Hilfe bei der Formatierung der Arbeit und Christiana Paniora dafür, dass sie meine beste Bürokollegin ist.

Frau Dr. Ingrid Huber und Frau Daniela Sebah von der Arbeitsgruppe „Forschung und Entwicklung“ (F&E) des Sachbereiches Molekularbiologie am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) Oberschleißheim gilt

mein Dank für die selbstverständliche und schnelle Hilfe bei Problemen der Molekularbiologie und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Dem Lehrstuhl für Tierhygiene der TU München unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. h.c. Johann Bauer danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung der LC-MS/MS-Messungen. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Christoph Gottschalk für die Durchführung der Messungen und die geduldige Hilfe bei der Auswertung und Darstellung der Ergebnisse.

Ich danke Frau PD Dr. Birgitte Andersen vom Department of Systems Biology, Center for Microbial Biotechnology der Technischen Universität Dänemark für die freundliche Bereitstellung der Referenzstämme.

Meinen Kulmbacher Freunden, besonders Dani, Silke, Chrissi, Nicki und natürlich dem Peter, danke ich für ihre Freundschaft und die schönen Stunden beim Spaziergehen, Sporteln, Feiern oder einfach nur Kaffee trinken. Ohne Euch wäre die „oberfränkische Fremde“ nicht zu meiner Heimat geworden. Dani, vielen Dank für Deine stundenlange Geduld, wenn ich mal wieder alle meine Probleme loswerden musste.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, ohne deren Liebe, Hilfsbereitschaft und finanzielle Unterstützung weder mein Studium, noch die Anfertigung dieser Arbeit möglich gewesen wäre. Meiner Schwester Heidi Biermaier danke ich dafür, dass sie mich während des Studiums nicht nur materiell unterstützt hat und mich immer wieder aufbaut, wenn es mir schlecht geht. Ebenso danke ich meinem Bruder Manfred Biermaier, der immer an mich glaubt und mir mit Rat und vor allem viel Tat zur Seite steht.

Isabella, ich danke Dir, einfach nur, weil es Dich gibt!